



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

博士學位論文

제주 재래굴, '부지화' 미숙과 추출물 및
감굴 정유 성분의
기능성 화장품 소재화 연구

濟州大學校 大學院

化 學 科

玄 珠 美

2016年 8月



제주 재래굴, '부지화' 미숙과 추출물 및
감굴 정유 성분의
기능성 화장품 소재화 연구

指導教授 李南昊

玄珠美

이 論文을 理學 博士學位 論文으로 提出함

2016年 6月

玄珠美의 理學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長

玄昌久



委員

周德珠



委員

崔英勳



委員

李旭宰



委員

李南昊



濟州大學校 大學院

2016年 6月



A Study on the Utilization of Extracts from
Immature Fruits of Jeju-native Citrus and 'Shiranuhi'
and Citrus Essential Oils as Cosmeceutical Ingredients

Ju Mi Hyun
(Supervised by professor Nam Ho Lee)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement
for the degree of Doctor of Philosophy

2016. 6.

This thesis has been examined and approved.

Chang-Gu HYUN
Duk Soo Kim
Young-Hun Choi
WookJae Lee
Nam Ho Lee

06/16

Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

LIST OF TABLES	iv
LIST OF FIGURES	v
SYMBOLS AND ABBREVIATIONS	viii
ABSTRACT	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	12
1. 재료	12
2. 실험방법	17
1) 부지화 미숙과 과피의 유효 성분 분리 및 분석	17
가. 부지화 미숙과 과피의 추출 및 용매 분획	18
나. MPLC를 이용한 EtOAc fraction의 활성 성분 분리	19
2) 제주 재래굴 추출물의 성분 분석	20
3) 감귤 정유의 추출 및 성분 분석	22
가. 온주, 하귤, 하밀감 및 신예감 정유의 추출	22
나. GC-MS 성분 분석	23
3. 생리 활성 평가	24
1) 총 페놀 함량 측정	24
2) 총 플라보노이드 함량 측정	24
3) DPPH radical scavenging 활성 검색	24
4) ABTS radical scavenging 활성 검색	25
5) 세포 배양	25
6) Nitric oxide (NO) 측정	25
7) Pro-inflammatory cytokine 억제 활성 측정	26
8) 미백 활성 측정	26

9) 세포 독성 평가	26
10) Immunoblotting	27
11) ESR spectrometer를 이용한 항산화 활성	28
가. ESR을 이용한 DPPH radical scavenging 활성 검색	29
나. ESR을 이용한 hydroxyl radical scavenging 활성 검색	30
다. ESR을 이용한 alkyl radical scavenging 활성 검색	31
12) 항균 활성 평가	32
III. 결과 및 고찰	33
1. 부지화 미숙과 추출물의 유효 성분 분리 및 생리 활성 평가	33
1) 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정	33
2) DPPH radical scavenging 활성 검색	36
3) ABTS radical scavenging 활성 검색	36
4) Nitric oxide (NO) 억제 활성 및 세포 독성 측정	38
5) Pro-inflammatory cytokine 억제 활성 측정	40
6) 미백 활성 측정	45
7) HaCaT human keratinocyte에 대한 독성 평가	47
8) 부지화 미숙과 과피 EtOAc fraction에서 분리된 화합물의 구조 결정	49
9) 분리된 화합물의 생리 활성 평가	55
10) 분리된 화합물의 항산화 활성	56
11) 분리된 화합물의 세포 독성 및 nitric oxide (NO) 저해 활성	58
12) Compound 4의 pro-inflammatory cytokine 저해 활성	60
13) 분리된 화합물의 미백 활성	65
2. 제주 재래귤 미숙과(과피, 과육) 성분 분석 및 항산화 활성	67
1) 제주 재래귤 미숙과 과피 및 과육 추출물의 HPLC 분석 결과	67
2) 추출물의 항산화 활성	84
가. 추출물의 DPPH radical 소거 활성	84
나. 추출물의 ABTS radical 소거 활성	85
3) 홍귤 미숙과 과피 추출물의 생리 활성 평가	88
가. 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량 측정	90

나. DPPH radical 소거 활성	91
다. ABTS radical 소거 활성	93
라. 홍굴 EtOAc fraction의 항염 효능 측정.....	95
마. Pro-inflammatory cytokine 억제 활성.....	97
바. iNOS, COX-2 단백질 발현량 측정	98
3. 감귤 정유의 성분 분석 및 활성 평가.....	100
1) 온주, 하귤, 하밀감 및 신예감 정유의 GC-MS 성분 분석.....	100
2) ESR을 이용한 항산화 활성	103
3) 온주, 하귤, 히말감 및 신예감 정유 성분의 항균 활성	105
IV. 종합 결론 및 고찰	107
V. 참고 문헌.....	108

LIST OF TABLES

Table 1. Scientific name of Citrus varieties	15
Table 2. HPLC chromatographic conditions of the control factors	21
Table 3. Gradient elution conditions for the separation of flavonoids	21
Table 4. ESR spectroscopy conditions of the control factors of DPPH radical scavenging activity	29
Table 5. ESR spectroscopy conditions of the control factors of hydroxyl radical scavenging activity	30
Table 6. ESR spectroscopy conditions of the control factors of alkyl radical scavenging activity	31
Table 7. NMR spectroscopic data for compound 1	50
Table 8. NMR spectroscopic data for compound 2	51
Table 9. NMR spectroscopic data for compound 3	52
Table 10. NMR spectroscopic data for compound 4	53
Table 11. Structure of isolated compounds from SIFP	55
Table 12. Flavonoid contents of citrus extract identified by HPLC	69
Table 13. Inhibitory concentrate (IC) ₅₀ value of DPPH and ABTS radical of citrus immature fruit	86
Table 14. Total phenolic and total flavonoid contents of solvent fractions from HIFP	90
Table 15. Chemical compositions of ‘Unshu’, ‘Natsudaidai’, ‘Hamilgam’, and ‘Shinyegam’ essential oil	92
Table 16. Antimicrobial activities of ‘Unshu’, ‘Natsudaidai’, ‘Hamilgam’, and ‘Shinyegam’ essential oil on <i>P. acnes</i>	106

LIST OF FIGURES

Figure 1. Chemical structures of citrus flavonoids.	5
Figure 2. Procedure of cosmetics material science research.	8
Figure 3. Oxidative stress leads to disease.	9
Figure 4. Picture of ‘Shiranuhi’ immature fruit.	13
Figure 5. Procedure of extraction and fractionation from SIFP.	18
Figure 6. Procedure of isolation of compounds from SIFP.	19
Figure 7. Picture of essential oil determination apparatus.	21
Figure 8. Paper disc diffusion test.	32
Figure 9. Total phenolic compound (A) and flavonoid (B) content of extract and solvent layers from SIFP.	34
Figure 10. Calibration curve for quantification of total phenolic compound content and flavonoid content.	35
Figure 11. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from SIFP.	37
Figure 12. ABTS radical scavenging activities of extract and solvent fractions from SIFP.	37
Figure 13. Inhibitory effects of extract from SIFP on nitric oxide (NO) production and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 murine macrophage cell line.	39
Figure 14. Inhibitory effects of solvent fraction from SIFP on nitric oxide (NO) production (A) and cell viability (B) in LPS-stimulated RAW264.7 murine macrophage cell line.	39
Figure 15. TNF- α production of EtOAc fraction from SIFP.	41
Figure 16. IL-1 β production of EtOAc fraction from SIFP.	42
Figure 17. IL-6 production of EtOAc fraction from SIFP.	43
Figure 18. PGE ₂ production of EtOAc fraction from SIFP.	44

Figure 19. Melanin contents and cell viability of extract and solvent fraction from SIFP in α -MSH stimulated B16F10 murine macrophage cell line.	46
Figure 20. Figure 20. Cell viability of extract and solvent fraction from SIFP in HaCaT human keratinocyte cell line.	48
Figure 21. Procedure of isolation of compounds from SIFP.	49
Figure 22. Structures of isolated compounds from SIFP.	54
Figure 23. DPPH and ABTS radical scavenging activities of compound 3 and 4	57
Figure 24. Cell viability and inhibitory effects of compound 3 and 4 from SIFP on the production of nitric oxide (NO) in LPS-stimulated RAW264.7 murine macrophage cell line.	59
Figure 25. TNF- α production of compound 4 from SIFP in LPS-stimulated RAW264.7 murine macrophage cell line.	61
Figure 26. IL-1 β production of compound 4 from SIFP in LPS-stimulated RAW264.7 murine macrophage cell line.	62
Figure 27. IL-6 production of compound 4 from SIFP in LPS-stimulated RAW264.7 murine macrophage cell line.	63
Figure 28. PGE ₂ production of compound 4 from SIFP in LPS-stimulated RAW264.7 murine macrophage cell line.	64
Figure 29. Melanin contents and cell viability of compound 3 and 4	66
Figure 30. HPLC chromatogram of standard flavonoids.	68
Figure 31. HPLC chromatogram of 'Dangyuja' immature fruit.	71
Figure 32. HPLC chromatogram of 'Byungkyool' immature fruit.	73
Figure 33. HPLC chromatogram of 'Jikak' immature fruit.	74
Figure 34. HPLC chromatogram of 'Yooja' immature fruit.	75
Figure 35. HPLC chromatogram of 'Kamja' immature fruit.	76
Figure 36. HPLC chromatogram of 'Jinkyool' immature fruit.	78
Figure 37. HPLC chromatogram of 'Binkyool' immature fruit.	79
Figure 38. HPLC chromatogram of 'Hongkyool' immature fruit.	80

Figure 39. HPLC chromatogram of ‘Pyunkyool’ immature fruit.	82
Figure 40. HPLC chromatogram of ‘Sadookam’ immature fruit.	83
Figure 41. Inhibitory concentrate (IC) ₅₀ value of DPPH (A) and ABTS (B) radical of citrus immature fruit.	87
Figure 42. Procedure of extraction and fractionation from HIFP.	89
Figure 43. DPPH radical scavenging activities of solvent fraction from HIFP.	92
Figure 44. ABTS radical scavenging activities of solvent fraction from HIFP.	94
Figure 45. Cell viability and nitric oxide production of EtOAc fraction from HIFP on RAW264.7 macrophage.	96
Figure 46. The effect of EtOAc fraction from HIFP on pro-inflammatory cytokine IL-6 level of LPS-induced RAW264.7 macrophage.	97
Figure 47. The effect of EtOAc fraction from HIFP of iNOS and COX-2 protein expression in RAW264.7 macrophage.	99
Figure 48. Major constitutes of the essential oil in citrus fruit peel.	101
Figure 49. DPPH radical, hydroxyl radical and alkyl radical scavenging activities of citrus essential oils by ESR.	104
Figure 50. Antimicrobial activities of citrus essential oils on <i>P. acnes</i> . ..	106

SYMBOLS AND ABBREVIATIONS

CC	column chromatography
COX-2	cyclooxygenase-2
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethylsulfoxide
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EtOAc	ethyl acetate
EtOH	ethanol
FBS	fetal bovine serum
Fr.	fraction
GC/MSD	gas chromatography mass spectrometry detector
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horse radish peroxidase
IC ₅₀	inhibition concentration of 50%
IL-1 β	interleukin-1 β
IL-6	interleukin-6
iNOS	inducible NOS
LPS	lipopolysaccharide
MeOH	methanol
MPLC	medium pressure liquid chromatography
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
<i>n</i> -BuOH	butanol
<i>n</i> -Hex	hexane
NMR	nuclear magnetic resonance
NO	nitric oxide

PBS	phosphate buffered saline
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PVDF	polyvinylidene fluoride
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SIFP	‘Shiranuhi’ immature fruit peel
TLC	thin layer chromatography
TNF- α	tumor necrosis factor- α
δ	chemical shift

ABSTRACT

The peel of Citrus fruit is rich in pectin, flavonoids, limonoids and coumarins that are valuable and functional dietary ingredients for human health. However, Citrus immature fruit peels produced by thinning were mostly discarded as a waste. Therefore, utilization of this peel waste has received much attention.

'Shiranuhi (*Citrus unshiu* Marc. x *C. sinensis* Osbeck) x *C. Reticulata* Blanco)' and 'Hongkyool (*Citrus tachibana* Tanaka)' immature fruit peel (SIFP, HIFP) used in this study was collected from Jeju Citrus Research Institute (RDA), and then extracted with 80% ethanol. After that, SIFP was analyzed and purified using RP-C₁₈ column equipped with MPLC. The structures of purified compounds were confirmed by ¹H and ¹³C NMR.

Ethyl acetate fraction of SIFP (SIFP-E) and compound **3-4** showed potent DPPH and ABTS radical scavenging activity. Anti-inflammatory activity of SIFP-E and compound **4** were examined using RAW264.7 murine macrophage cells stimulated with LPS. As a result, SIFP-E and compound **4** had inhibited a nitric oxide (NO) and pro-inflammatory cytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6 and PGE₂) productions significantly.

Solvent fractions of HIFP were investigated for anti-oxidative and anti-inflammatory effects. The total polyphenol content and total flavonoid content were the highest in the butanol fraction of 'Hongkyool' (HIFP-B, 5,344 mg/g). The HIFP fractions showed the strong antioxidant activities by DPPH method and ABTS method. The 'Hongkyool' ethyl acetate fraction (HIFP-E) inhibited the generation of nitric oxide, IL-6, iNOS and COX-2 protein expression. Based on these results, we suggest that 'Shiranuhi' and 'Hongkyool' immature fruit peel maybe has the possibility for use as an anti-inflammatory and anti-oxidant agent.

This study was also designed to analyze the chemical composition of essential oil in 4 cultivars of Citrus fruit and to test their biological activities. Essential oils were obtained by steam distillation from fruits collected from Jeju Island and were analyzed using GC/MSD and thirteen components were identified in the essential oil. Since acne vulgaris is the combined result of a bacterial infection and the inflammatory response to the infection, we examined whether citrus essential oils (CEOs) possessed antibacterial activities against skin pathogens. As a result, CEOs showed good antibacterial activities against drug-susceptible and -resistant *Propionibacterium acnes*. In this study, CEOs were examined on DPPH, hydroxyl, alkyl radical scavenging activities by ESR spectrophotometer, respectively. Based on these results, we suggest that essential oil of citrus fruit could be used as an antibacterial and antioxidant agent.

I. 서론

감귤류(Citrus)는 운향과(Rutaceae), 감귤아과(Aurantinoideae)에 속하는 식물 군으로써 현재 재배하고 있는 감귤들은 분류상 감귤속(*Citrus* L.), 금감속(*Fortunella Swingle*), 탕자속(*Poncirus* RAF.)의 3속이다. 제주도에 감귤이 도입된 것은 서기 476년, 백제 문주왕 2년에 탐라의 특산물을 공물로 헌상 했다는 고려사지의 기록이 있으며, 이 때 특산물에 감귤이 포함된 것으로 추정된다. 이 당시의 재배 품종은 거의 제주 재래종으로 22개 품종이 재배되었으나 생식용으로는 맛이 없고 쓴 맛이 강해 점차 새로운 품종으로 개량되어 지금은 병귤, 당유자, 동정귤, 홍귤, 진귤, 빈귤, 사두감, 감자, 유자, 편귤 등 몇 가지 재래종만이 제주에서 찾아볼 수가 있다. 현재 제주도에 재배 또는 보존되고 있는 감귤류는 온주밀감이 97% 이상을 차지하고 있으며 tangor, 금감, orange, 그리고 상업적인 재배는 거의 이루어지지 않으나 유전자원으로써 중요성을 갖고 있는 재래귤 등이 있다.²

제주도에서 개량종 감귤 재배가 시작된 것은 1911년 서흥동에 프랑스 출신 천주교회 신부에 의해 15그룹이 일본에서 처음으로 도입, 재배가 시작되었고, 1930년대 서귀포 주변 지역으로 확산되었으며, 1960년대에 들어서 감귤 수요가 증가하고, 1968년 감귤 증산정책이 책정되면서 재배가 급격히 확산되었다.¹

제주산 감귤은 맛과 향이 좋고 각종 비타민을 함유하고 있으며 한국인에게 생식으로 가장 많이 이용되는 과일 중 하나이며 약용으로도 예로부터 그 효과를 인정받아 두루 사용되어 오고 있다. 또한, FTA 체결과 과도한 감귤 생산량으로 인하여 미국산 오렌지에 대응하는 신품종 감귤의 개발 및 과잉 생산된 제주산 감귤의 새로운 용도 및 수요를 찾는 연구가 활발히 진행되고 있다.

이러한 감귤은 현대인에게 필요한 생리활성 물질들이 풍부한 생물산업 소재로 그 가치가 매우 높다고 할 수 있으며, 식품 산업은 물론 화장품 산업과 의약산업 등 다양한 분야에서 연구 개발이 진행되고 있다. 1960년부터 2005년 6월까지의 감귤류에 관한 국내특허 532건 중 식품(271건), 의약품(68건),

화장품(58건)에 관계된 출원이 74.6%에 달하고 있으며, 향후 감귤류의 다양한 효능에 대한 연구와 아울러 2차 가공산업 분야에 대한 투자와 연구개발이 필요하다.³

감귤류(*Citrus unshiu*)의 과피는 동양의학에서 기관지와 천식 환자에게 사용되어 왔으며 최근에는 감염성질환이나 암 등을 예방한다고 보고되었다.^{4,5} 감귤류에는 비타민 C, 엽산, 식이섬유, 카로티노이드(carotenoids), 플라보노이드(flavonoids) 등이 함유되어 있고, 감귤류 플라보노이드는 항균, 항산화, 항암, 항염증 효과 등 많은 기능을 갖는다고 보고되었다.^{6,7}

플라보노이드는 자연계에 널리 분포하는 담황색 또는 노란색 계통의 색소화합물로서 benzopyrane 계통이며 carotenoid 색소와 함께 가장 중요한 색소 중에 하나이다. 식물 중에는 대부분 당과 결합된 배당체 형태로 존재하며, 하루 한 사람 섭취량이 약 23~1,000 mg 정도이고 특이한 부작용이 없는 것으로 알려져 있다.⁸ 감귤류에 존재하는 플라보노이드는 분자구조에 따라 Figure 1에서 나타낸 바와 같이 6개 그룹으로 분류되며,^{6,9} 특히 과육보다는 과피와 종자에 풍부하게 함유되어 있다.⁹

최근 연구 결과에 따르면 감귤류에 함유되어 있는 다양한 플라보노이드는 대부분 수확 시기가 늦어질수록 감소하는 경향을 보이며,¹⁰ 완숙과보다는 미숙과에 많은 양의 플라보노이드가 함유되어 있다고 보고되어 있다.

감귤류에 함유된 플라보노이드는 narirutin, naringin, hesperidin 등의 배당체(glycone) 또는 naringenin과 hesperetin 등의 비당체(aglycone) 형태로 존재한다. 비당체는 배당체보다 좀 더 효과적으로 우리 몸에 흡수되기 때문에 플라바논의 rutinoside 형태의 물질이 가수분해 과정을 거쳐 비당체의 형태로 전환되면 흡수가 촉진되어 혈장, 담즙, 소변 등에 더 높은 농도로 존재하여 대식세포에서의 염증억제와 암세포에서 항암효과를 나타낸다고 보고되어 있다.⁶

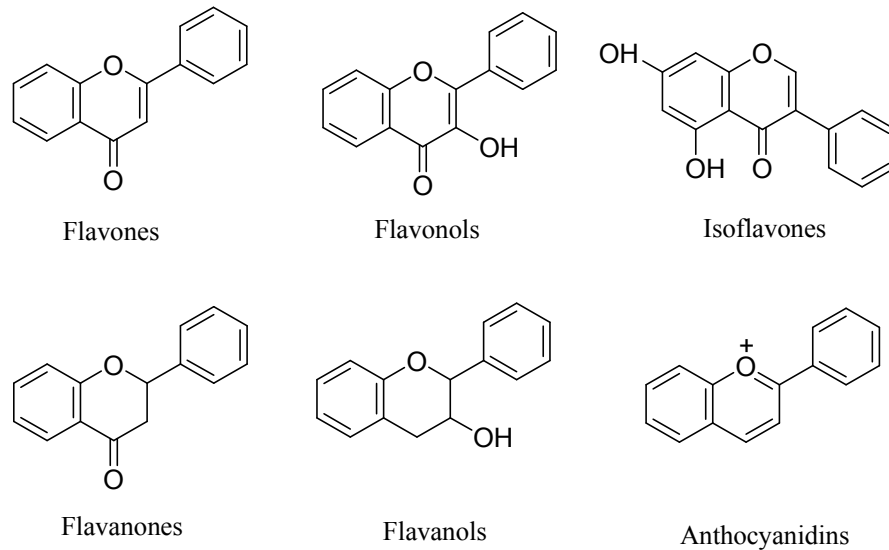


Figure 1. Chemical structures of citrus flavonoids.

감귤에서는 이러한 플라보노이드 뿐만 아니라 과피의 유포(油胞)층에 함유되어 있는 정유(精油)에 관한 연구도 주목받고 있다. 식물의 정유(essential oil)는 식물 내 함유되어 있는 방향성 기름 성분으로 주로 식물의 내분비선에서 분비되는 2차 대사산물이며, 최근 천연원료에 대한 관심이 고조되면서 여러 정유성분에 대한 방향효과,¹¹ 항염,¹² 항균¹³ 및 방부효과¹⁴에 대한 연구, 식품 및 의약품, 화장품 등의 첨가제로써의 활용이 활발히 이루어지고 있는 실정이다.

정유는 10~30개의 탄소원자를 함유하는데 분자량이 작을수록 쉽게 기화하므로 대부분의 휘발성 방향 물질은 isoprene 2개 또는 3개로 구성된 mono-terpenoid와 sesqui-terpenoid이다. 정유에 들어있는 향 물질은 단일 성분 보다는 다수의 화학 성분이 상호작용하여 단일 성분의 성능을 높여주는 시너지 효과(synergy effect)를 일으키거나, 단일 성분의 부작용을 막아주는 억제 작용(quenching effect)이 나타나는 것으로 알려져 있다.¹⁵

천연물로부터 정유를 추출하는 방법은 크게 증류법(distillation), 압착법(expression), 용매추출법(solvent extraction)으로 나뉘어 진다. 증류법은 정유를 추출하는데 있어 90% 이상 사용되며, 그 종류에는 water distillation, steam distillation, water and steam distillation, dry distillation 등이 있다.¹⁶

감귤의 정유는 동일 종에서도 기후, 풍토, 과실의 운숙 및 저장의 시간적 변화 등에 의해서 성분의 변화가 있으며 세정제, 식품향료 의약품 등에 첨가제로 널리 이용되고 있다. 주성분인 limonene은 인체 및 환경에 유해한 영향을 주지 않는 물질로 1996년 미국 마케팅 선정 에디슨 상을 수상한 특수 강력 세정제로 선진국에서는 보편적으로 사용하는 세정제이다.³

감귤 정유와 관련하여 진행된 연구들은 온주밀감 완숙과 유래 감귤 정유에만 국한되어 항균활성에 대한 연구만이 진행되어 오다가 최근 부지화¹⁷ 및 감귤류 미숙과¹⁶에 관한 연구가 진행되어 있다.

본 연구에서는 최근 도입된 신품종의 정유와, 생식용으로는 활용이 어려운 재래귤 및 한 해 수만 톤씩 버려지는 감귤 폐자원을 대상으로 하였다. 이러한 제주산 감귤류의 기능성 소재 발굴을 목표로 감귤 유래 천연 추출물의 생리 활성 평가와 그 기전 연구를 통한 기능성 화장품 소재화 가능성을 검증하였다.

□ 기능성 화장품 소재화 연구

최근 건강한 아름다움을 추구하고자 하는 욕구는 사회 전반에 걸쳐 매우 팽대되고 있고 이러한 사회적 여건의 조성은 특히 화장품 산업의 발전에 급속하게 확대되고 있다. 또한 소비자의 의식수준이 높아지면서 주름개선, 미백, 보습증가, 탄력증가 등에 영향을 미치는 생물학적 부분에 보다 특이적으로 작용하여 적은 양으로도 높은 기능을 가지는 생리활성 천연물의 발굴에 많은 관심이 집중되고 있으며 피부친화적이고 안전한 식물추출물을 대상으로 화장품의 기능성을 확인하는 연구가 활발하게 진행되고 있다.¹⁸⁻²⁰ 이에 따라 세포에 에너지를 주거나, 신진대사를 활발하게 하고 수분을 유지시키며, 유해한 활성산소를 제거해 주는 등의 효과가 있는 제품들이 주로 연구되고 있으며 미백, 노화억제, 자외선 차단, 욱모, 비듬방지용 제품을 예로 들 수 있다.

기능성 화장품은 화장품과 의약품의 중간적인 성격을 갖는 제품이라 볼 수 있다. 일반 화장품이 안전성을 강조한 제품임에 비해 기능성 화장품은 안전성 외에 특히 효능·효과를 강조한 제품이다. 기능성 화장품은 영어로 코스메틱(cosmetic)과 메디컬(medical)의 합성어인 ‘코스메디컬(cosmedical)’ 또는 코스메틱과 약물을 의미하는 파마슈티컬 (pharmaceutical)의 합성어인 ‘코스메슈티컬(cosmeceutical)’ 등으로 불려지기도 한다. 즉, 기능성 화장품이란 이전의 단순한 피부 보습, 피부 보호의 차원에서 벗어나 피부의 주름, 기미, 주근깨, 죽은 각질, 피부 건조 등과 같은 문제점들을 적극적으로 해결하는데 도움을 주는 화장품을 일컫는다. 이러한 기능성 화장품은 의약품과 달리 일정기간 특정한 부위에 사용하지 않고 장기간 지속적으로 인체 전체를 대상으로 사용하는 물품이기 때문에 인체에 대한 부작용이 없어야 한다.

매일 사용하는 화장품이 갖추어야 할 요건으로는 안전성, 안정성, 사용성, 유효성 등을 들 수 있다. 여기서 안전성이 좋다는 것은 피부에 대한 자극, 알러지, 독성 등이 적다는 것을 의미하고, 안정성이 좋다는 것은 제품이 일정기간 동안 변질되거나 분리되지 않는다는 것을 의미한다. 또 사용성이 좋다는 것은 피부에 바를 때 손놀림이 쉽고 잘 퍼 발라진다는 것을 의미하는 것이다. 마지막으로 유효성이 좋다는 것은 피부에 바른 후 적절한 보습,

자외선 차단, 노화억제 등 구체적인 효능·효과를 부여해 준다는 것을 말한다. 그러므로 기능성 화장품이란 구체적인 효능·효과가 강조된 의약품적 성격과 피부에 대한 안전성이 강조된 화장품적 성격을 동시에 가지고 있어야 한다.²¹

이러한 기능성 화장품 소재로 활용 가능한 기능성 원료의 개발에는 대상으로 하는 기능성에 대한 생화학적 메커니즘을 충분히 이해하고 이를 토대로 기능성 원료를 검색할 수 있는 분석기법이 확보되어야 한다. 또한 천연물에서 추출하거나 화학 합성 또는 미생물 발효 등을 통해 기능성 원료를 얻을 수 있는 방법을 확립하고 기능성 원료의 효능·효과를 분석기법을 통해 확인하고 기능성 원료의 인체에 대한 안전성을 실시하는 순서로 이루어진다(Figure 2).



Figure 2. Procedure of cosmetics material science research

(출처: 한국피부임상과학연구소)

피부는 다양한 오염물질, 세균, 스트레스, 자외선에 노출됨으로써 반응성이 매우 큰 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 유도된 광산화적 손상을 지속적으로 받게 된다. ROS란 $^1\text{O}_2$ (singlet oxygen) 및 $\cdot\text{OH}$ (hydroxyl radical)를 비롯하여 $\cdot\text{O}_2^-$ (superoxide anion radical), H_2O_2 (hydrogen peroxide)가 있고, 그 외에 $\text{ROO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, ROOH 및 HOCl 등을 포함한다.

이들 ROS 중에서 $^1\text{O}_2$ 및 $\cdot\text{OH}$ 은 피부 광 손상에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이들은 피부 항산화제 파괴, 지질 과산화반응의 개시, 단백질 및 DNA 산화, 콜라겐 및 히아루론산과 같은 결합 조직 성분의 사슬 절단 및 비정상적인 교차 결합에 의한 주름 생성, 멜라닌 생성 과정 등에 참여하여 피부 노화를 가속시킨다(Figure 3).

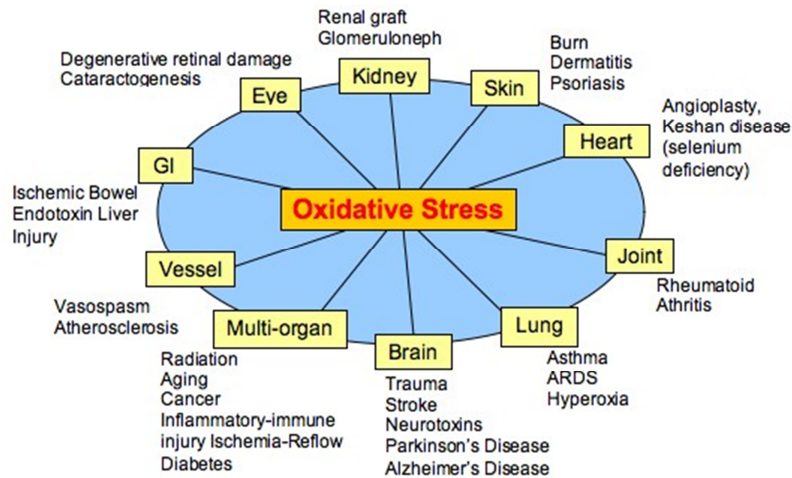


Figure 3. Oxidative stress leads to disease.

활성산소를 조절할 수 있는 항산화제는 식물에 다량 함유되어 있다. 식물의 잎, 껍질 및 꽃 등에 광범위하게 분포하는 플라보노이드류는 모두 페놀산, pyrane ring 을 가지고 있으며 크게 6가지(flavanols, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones, anthocyanidins)로 구분된다.

이 플라보노이드류는 항암, 항염 및 자외선으로부터의 보호 등과 같은 다수의 유익한 효과들 때문에 다양하게 천연적인 치료제들로 사용되고 있다. 현재 가장 주목 받고 있는 항산화 성분들은 식물에서 추출하는 것들이 많고, citrus bioflavonoids (자몽, 오렌지, 레몬, 탄저린 등에서 추출)가 가장 유명하다. 특히, 피크나제놀(pycnogenol)이라 불리는 성분은 주로 소나무 껍질과 포도 씨에서 추출된 프로안토시아닌의 정제된 복합물로서, 지난 40년간 연구되어 온 대표적인 플라보노이드의 하나이다.

또한 안토시아닌(빌베리, 포도껍질 추출물), 포도 씨에서 추출한 폴리페놀, 천연 카로티노이드 색소의 일종으로 토마토에서 추출된 리코펜, 적색과 황색의 열대어와 갑각류 등에 함유된 물질인 아스타산틴(astaxanthin)도 항산화력이 강력한 것으로 알려져 있다. 이 밖에 아연, 철, 구리, 망간 같은 미네랄들도 항산화제로서 역할을 한다.

합성물질로 활성산소를 조절할 수 있는 항산화제에는 일반적으로 흔히 사용되는 페놀계 합성 항산화제인 butylated hydroxyanisole (BHA)와 butylated hydroxytoluene (BHT) 등이 탁월한 항산화력과 경제성 등으로 널리 이용되어 왔으나 안정성 논란으로 인하여 대부분 사용 규제를 받고 있는 실정이다. 화장품에서는 주로 (+)- α -tocopherol 및 L-ascorbic acid가 주목 받고 있으며, 제품 중에서 안정성 때문에 이들 대신 (+)- α -tocopherol 유도체나 L-ascorbic acid 유도체가 많이 사용되고 있다. 그러나 이들 또한 항산화 효과 측면에서 미흡한 점이 많아 새로운 천연 항산화제를 개발하여 응용하고자 하는 연구가 많이 진행되고 있다. 더불어 다양한 천연 소재를 이용한 미백, 향노화, 자외선 차단 기능을 가진 기능성 화장품의 개발도 활발히 이루어지고 있다.

기능성 화장품 소재는 항산화제뿐만 아니라 염증과 관련된 소재의 탐색도 주목받고 있다. 염증은 우리 인체에 가장 흔히 발생하는 질환으로써, 염증 반응은 생체나 조직에 물질적 작용 또는 화학물질, 세균 감염 등에 대한 생체 조직의 방어 반응 중 하나이며, 그 손상 부위를 수복하거나 재생하려는 기전이다.^{22,23}

염증 반응에 관여하는 주요 세포는 macrophage로 알려져 있으며, 여러 자극이나 면역 세포들이 분비하는 사이토카인에 의해 활성화 되어 염증 매개

물질들인 nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂), proinflammatory cytokine을 생성함으로써 통증, 부종, 열 등의 염증 반응을 유발시키고 염증 부위로 면역세포의 이동을 촉진시킨다.^{24,25}

이 중 반응성이 높은 물질인 NO는 NO synthase (NOS) 중 inducible NOS (iNOS)에 의한 생성이 절대적으로 많으며 염증상태에서의 과도한 NO 생성은 염증 반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하고 염증을 심화시켜 조직 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 일으킨다.^{26,27}

또 다른 염증인자인 cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid를 prostaglandins로 전환하는 효소로 COX-1과 COX-2로 나뉘지는데 COX-1은 여러 조직에서 발견되는 반면 COX-2는 염증 자극에 의해 단시간에 유도되는 발현 현상을 나타내어 서로 다른 역할을 하는 것으로 알려져 있다.²⁸⁻³¹ COX-2는 염증 자극원에 의해 염증성 세포에서 유도되며, COX-2에 의해 생성되는 PGE₂는 통증, 발열에 관여하는 염증 매개체로써 염증반응, 면역 반응에 관여하고 혈관 신생(angiogenesis)을 촉진시키는 등 암 발생에도 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다.³²⁻³⁴

면역력에 결함이 생겨 면역 반응이 충분하게 일어나지 않으면 감염을 유도할 수 있는 반면 면역을 위한 염증 반응이 과도하게 일어나면 만성 질환을 일으키게 된다. 대식세포(macrophage)는 면역과 염증반응에서 주요 역할을 하고 면역 반응시에는 감염 초기에 생체 방어를 위해서 여러 사이토카인(cytokine)과 산화질소(nitric oxide, NO) 등을 생산한다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

□ 부지화

부지화(*Citrus unshiu* Marc. x *C. sinensis* Osbeck) x *C. Reticulata* Blanco)는 1973년 일본 과수시험장 구치노쓰 지장에서 청견 x 폰칸(중야3호)를 교배하여 육성한 교잡종으로써 만다린 계통의 일종이다. 일본에서는 처음에 꼭지 깃이 튀어나온 과실모양을 나타내어 ‘데코폰’이라고 불렀으나, 1990년에 품종 이름을 ‘부지화(不知火, しらぬひ, shiranuhi)’라고 명명하였다. 제주도에는 1991년 일본 사가현 과수품종육성센터를 통하여 공식적으로 도입되기 시작하여 1997년에는 80 ha에서 500톤 정도 생산됨으로써 본격적인 출하가 이루어졌다. 이 때 부지화 꼭지 모양이 한라산 정상에 봉우리와 비슷하다고 하여 ‘한라봉’이라는 상표명을 붙여 판매되기 시작하여 1998년 10월 부지화에서 한라봉으로 상표명칭이 결정되었고, 지금까지 출하와 판매에 이 명칭을 사용하고 있다. 부지화는 과즙의 당도가 다른 감귤보다 높고 씹는 맛이 좋을 뿐 아니라 향기가 좋으며 과실 크기에 비해 껍질 벗기기도 쉬워 소비자로부터 높은 평가를 받고 있다.³⁵

온주밀감과 달리 개화 이듬 해 생산되는 만감류는 2012년 통계자료³⁶에 따르면 부지화가 4만 톤 이상, 기타 만감류(세토카, 감평 등)가 1만 5천톤 이상 유통되고 있다고 보고되어 있으며, 매년 재배면적이 급속히 늘어나고 있다. 이러한 만감류는 생산량 조절 및 고품질 상품 생산을 위해 필수적으로 적과 작업을 실시하는데 이를 통하여 1만 톤 이상의 미숙과가 발생할 것으로 예상되며 이는 대부분 폐기되고 있는 실정이다.

또한 감귤류 미숙과에는 완숙과에 비하여 플라보노이드 등 다양한 기능성 물질이 다량 함유되어 있다고 알려져 있다. 이에 따라 버려지는 미숙과의 유효성분을 효율적으로 추출 및 분리하고 향염 또는 미백 효능의 검토를

통하여 차후 화장품이나 의약품 등 고부가가치 소재로써의 활용 가능성에 대한 연구가 필요하다. 매년 적과 작업 시 폐기되는 잉여물을 산업현장에서 활용하게 될 경우 부가가치가 상승함에 따라 농가의 수익확대가 기대될 뿐만 아니라, 만감류 미숙과를 활용한 기능성 성분의 효율적인 추출 및 유효 성분의 분리는 향염 또는 미백 등 다양한 기능성 화장품 및 의약품 소재로써의 활용을 기대할 수 있다.

현재까지 부지화 미숙과에 대한 연구는 에센셜오일의 항산화 및 항균활성 등이 보고되어 있으나, 아직 이들 활성에 관련한 유효 활성 성분의 분리가 진행되지 않아 본 연구를 진행하게 되었다.¹⁷



Figure 4. Picture of 'Shiranuhi' immature fruit

□ 제주 재래귤

당유자, 진귤, 병귤, 유자, 청귤, 동정귤, 홍귤, 빈귤, 사두감 등 제주도 전역에 산재하고 있는 재래귤은 동의보감에 의하면 심근수축력과 심박출량을 증가시키고 뇌 혈류량을 증가시키는 효능이 있으며, 소염작용뿐만 아니라 피부 알레르기 반응 억제, 항균 작용, 항 바이러스, 항산화 작용이 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 점 때문에 옛날부터 임금님께 진상을 하여 건강을 유지할 수 있도록 했던 것으로 전래되고 있다. 제주도에서만 자생하는 재래귤은 다른 과실에는 찾아볼 수 없는 특이한 성분과 기능성 물질을 함유하고 있어서 다양한 효능이 있는 것으로 알려져 있으나, 이들 재래귤의 성분 분석 및 평가를 통한 기능성 연구가 아직 체계화 되어 있지 않다. 또한 재래귤은 생식용으로는 맛이 없고 쓴맛이 강해 점차 새로운 품종으로 개량되어 지금은 병귤, 당유자, 동정귤, 홍귤, 진귤, 빈귤, 사두감, 감자, 유자, 편귤 등 몇 가지 재래종만이 남아있다.

본 연구에서는 기능성 식품 및 화장품 소재로써 재래귤을 재조명할 수 있도록 재래귤 미숙과 10종에 대한 HPLC 분석 및 항산화활성 평가를 통해 재래귤에 대한 기초자료를 구축하고자 한다.

본 실험에 사용된 제주 재래귤 10종은 Table 1에 나타내었으며, 제주도 서귀포시 감귤연구소 포장에서 재배된 미성숙한 과실을 2014년 9월 16일에 수확하여 사용하였다.

Table 1. Scientific name of Citrus varieties

No.	Common name	Scientific name
1	당유자 Dangyuja	<i>C. grandis</i> Osbeck
2	병귤 Byungkyool	<i>C. platymamma</i> Hort. ex Tanaka
3	지각 Jikak	<i>C. aurantium</i> Linn
4	유자 Yooja	<i>C. junos</i> Sieb. ex Tanaka
5	진귤 Jinkyool	<i>C. sunki</i> Hort. ex Tanaka
6	빈귤 Binkyool	<i>C. leiocarpe</i> Hort. ex Tanaka
7	감자 Kamja	<i>C. benikoji</i> Hort. ex Tanaka
8	홍귤 Hongkyool	<i>C. tachibana</i> Hort. ex Tanaka
9	편귤 Pyunkyool	<i>C. tangerina</i> Hort. ex Tanaka
10	사두감 Sadookam	<i>C. pseudogulgul</i> Hort. ex Tanaka

□ 감귤 정유

본 연구에 사용된 정유는 온주밀감, 하귤, 하밀감 및 신예감 과피에서 추출하였다. 온주밀감(*Citrus unshiu*)은 제주도에서 생산하는 감귤의 90%를 차지하고 있는 대표적인 품종으로 생과용뿐만 아니라 가공용으로 소비되고 있다. 하귤(*C. natsudaidai*)은 4월 이후에 성숙하는 감귤로 기능성 품종으로 주목받고 있으나 씨가 많은 특성이 있어 가공적성 측면에서의 경제적 재배가 어렵다. 하밀감(*C. unshiu* x *C. natsudaidai*)은 감귤의 기능성 성분의 산업화를 위한 원료 품종 개발을 위해 1992년 감귤연구소에서 청도온주와 하귤을 교배하여 육성한 품종으로 성숙기가 3월이며 씨가 없고 껍질 두께가 온주밀감보다 두껍고 신맛과 쓴맛이 상당히 오래가는 특성이 있다. 신예감은 2014년 봄부터 농가에 보급되고 있는 신품종으로 향기가 좋고 당도가 12°Bx로 높으면서 껍질 까기가 쉬워 온주밀감과 만감류의 장점을 두루 갖춘 품종이다. 2002년 ‘청전’과 ‘월킹’을 교배해 2008년에 최초로 착과시켰으며 지역적응시험을 통해 특성검정을 마쳐 2012년 품종보호출원을 완료했다. 수확 시기는 12월 하순에서 1월 상순으로 연말연시 과일 수요에 대응할 수 있는 것이 최대 장점이며, 1월 말까지 수확을 늦춰도 맛의 변화 없이 고품질의 열매를 수확할 수 있다. 또한 비가 많이 와도 껍질이 뜨는 현상이 없으며 추위에도 비교적 강해 겨울철 서귀포 해안가에서 노지 재배도 가능하다.

기존 온주밀감 및 하귤과 더불어 기능성 성분이 강화된 감귤 신품종 하밀감 및 신예감을 대상으로 건강 기능성 식품, 천연 향산화제, 기능성 화장품 등 다양한 소재로써의 활용 가능성에 대한 기초 자료를 제공하고, 그 이용성을 증대시키고자 본 연구를 수행하였다.

2. 실험방법

1) 부지화 미숙과 과피의 유효 성분 분리 및 분석

부지화 미숙과 과피의 유효 성분의 분리를 위하여 MPLC (Medium Pressure Liquid Chromatography, KP-C₁₈-HS, Biotage Co.)를 사용하였고, 분리 과정에서 사용된 TLC (Thin Layer Chromatography)는 precoated silica gel aluminum sheet (Silica gel 60 F₂₅₄, 2.0 mm, Merck Co.)를 사용하였다. TLC 상에서 spot의 확인은 UV lamp (254 nm)를 사용하거나, visualizing agent에 침적시킨 후 heat-gun을 이용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 KMnO₄ 수용액(3% KMnO₄, 20% K₂CO₃, 0.25% NaOH) 및 1% anisaldehyde-MeOH를 필요에 따라 사용하였다.

구조분석에 이용된 NMR (Nuclear Magnetic Resonance)은 AVANCE III (FT-NMR, Bruker Co.)를 이용하였고, NMR 측정 시 용매는 Merck의 NMR 전용 용매로 CD₃OD, CDCl₃, DMSO를 사용하였다.

분리된 compound가 단일물질임을 확인하기 위한 HPLC 분석에는 HPLC (Waters Co. 600 Pump)를 이용하였고, column 및 검출기는 각각 Shimpack VP-ODS C₁₈ column (4.6 × 250 mm, 5 μm; Shimadzu) 및 UV-Visible Detector (Waters Co. 966 PDA 254.0 nm)를 사용하였다.

가. 부지화 미숙과 과피의 추출 및 용매 분획

본 실험에 사용된 부지화 미숙과는 제주도 서귀포시 감귤연구소 포장에서 재배된 과실을 2014년 9월 수확하여 사용하였다. 수확한 과실은 선별 및 세척 후 과피와 과육을 분리하고, 과피를 60°C dry oven에서 12~48시간 건조시킨 후 분쇄하여 사용하였다. 부지화 미숙과피의 추출을 위해 건조 및 분쇄된 과피 1,085 g에 80%(v/v) 에탄올 20 L를 넣고 실온에서 24시간 교반하였다. 침출시킨 시료를 감압 여과 장치를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리된 잔사에 대하여 동일한 조건으로 3회 반복 실시하였다. 이렇게 여과하여 얻어진 40°C이하의 수욕상에서 회전 농축기(rotary evaporator)로 농축하여 80% EtOH 추출물 146.8 g을 얻었다. 얻어진 80% EtOH 추출물 중 60 g을 증류수 1 L에 현탁시키고, 분별 깔대기를 이용해 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O 순서로 총 4개의 용매 분획층을 얻었다(Figure 5).

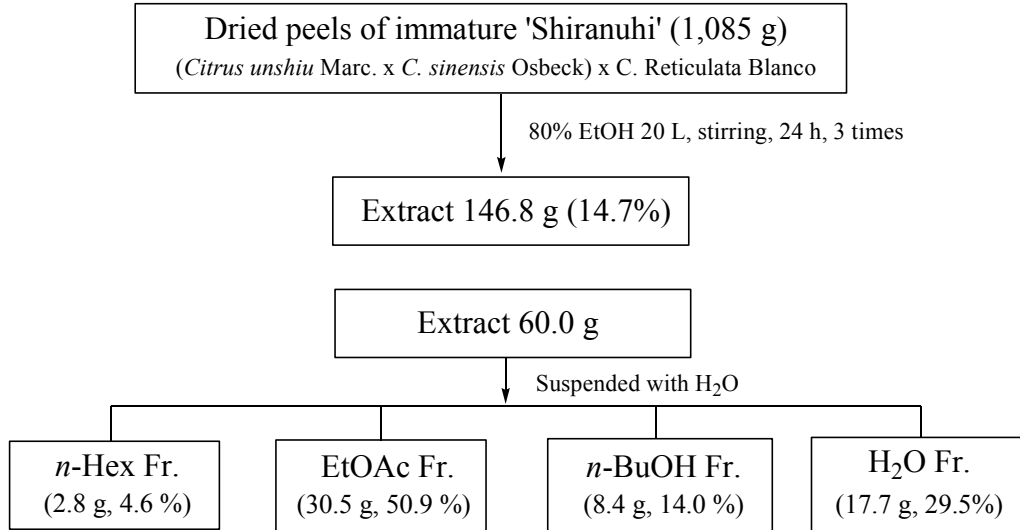


Figure 5. Procedure of extraction and fractionation from SIFP.

나. MPLC를 이용한 EtOAc fraction의 활성 성분 분리

용매 분획 후 얻어진 각 분획 층들 중 ethyl acetate (EtOAc) 분획물 5.0 g을 극성에 따라 순차적으로 세분화하기 위하여 MPLC (Medium Pressure Liquid Chromatography)를 수행하였다. EtOAc 분획물 5.0 g을 MeOH 8 mL에 녹이고 0.45 μ m PVDF filter를 이용해 여과한 후 주입하였으며 column은 역상 실리카겔(C₁₈)을 사용하였다. 기울기 용리법을 이용해 MeOH : H₂O (10→90%, 80 min), MeOH (90→100%, 10 min)의 용매 조건들로 극성 비율을 순차적으로 낮추면서 각각 40 mL씩 용출시켜 총 39개의 fraction을 얻었다.

MPLC fraction들 중 Fr. 14로부터 compound 1 (28.5mg)을 얻었고, Fr. 18에서 MeOH을 사용해 재결정하여 compound 2 (133.6 mg)를 얻었다. Fr. 27로부터 compound 3 (118.3 mg)을 얻었으며, Fr. 31로부터 compound 4 (126.8 mg)를 얻었다(Figure 6).

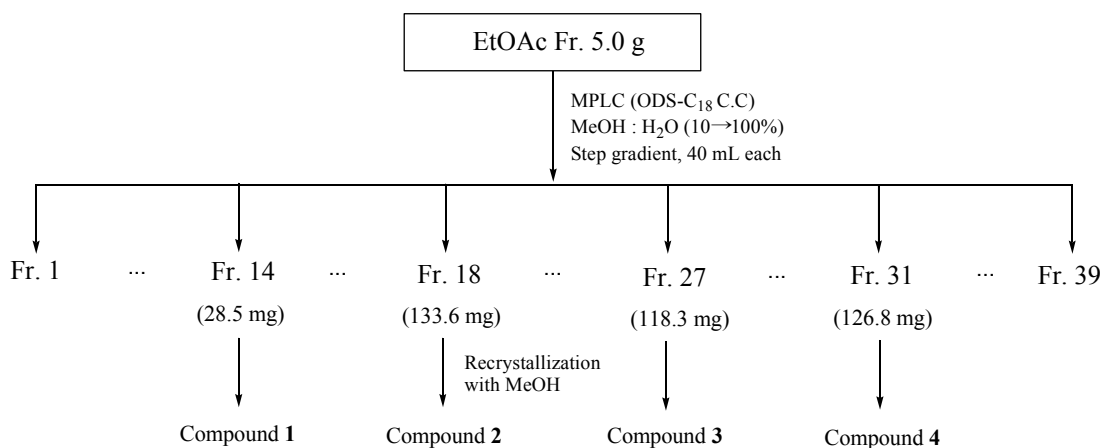


Figure 6. Procedure of isolation of compounds from SIFP.

2) 제주 재래귤 추출물의 성분 분석

본 연구에서 시료의 추출, 용매 분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merck 및 Junsei의 제품을 사용하였다. 제주 재래귤의 플라보노이드 함량 분석은 수확한 과실의 과피와 과육을 건조시킨 후 분말화 하여 사용하였다. 각 품종 별 과피 추출물은 건조 과피 1 g에 70% 메탄올 30 mL를 가하여 초음파 추출기로 1시간 동안 추출하였다. 상층액을 0.45 μ m syringe filter로 여과한 후 감압 농축하고 동결 건조 한 건조된 분체를 실험 재료로 사용하였다. 분석에 사용된 HPLC (High performance liquid chromatography)는 e2695 Separations module (Waters, USA)을 사용하였으며, 이동상에 사용된 용매는 Merck의 HPLC grade를 사용하였다. HPLC 분석은 Waters 2489 UV/visible detector, Waters e2695 Separations module (Waters, USA)을 사용하였으며, 분석 column은 YMC-Pack Pro C₁₈ RS (250 x 4.6 mm, 5 μ m), 유속은 0.6 mL/min으로 유지하였고, 검출기 파장은 280 nm이며 0.1% acetic acid와 acetonitrile 용액을 사용하여 기울기 용리시켰고, 데이터 분석 S/W는 Waters의 Empower system을 이용하였다. HPLC 기기분석 및 용리 조건은 Table 2-3과 같다. HPLC를 이용하여 감귤류에 많이 함유되어 있는 것으로 알려진 rutin, narirutin, hesperidin, neohesperidin, neohesperidin dihydrochalcone (NHDC), quercetin, apigenin, naringenin, hesperetin, nobiletin, tangeretin, auraptene 등 13종을 대상으로 분석하였다. 검정곡선 작성용 표준용액은 위의 13종 플라보노이드 성분들에 대해 Sigma사의 특급시약을 MeOH과 DMSO에 녹여 각각 25, 50, 100, 200 ppm 농도가 되도록 희석하여 조제하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복하였으며 결과값은 평균±표준편차로 나타내었다.

Table 2. HPLC chromatographic conditions of the control factors

Control Factor	Conditions
Injection volume	10 μ L
Column	YMC Pro C18 _{RS} (250 x 4.6 mm, 5 μ m)
Mobile phase	A: acetonitrile, B: 0.1% acetic acid
Flow rate	0.6 mL/min
Column Temperature	40°C
Wavelength	280 nm
Detector	Waters 2489 UV/Visible (Waters, USA)
Separation Module	Waters e2695 (Waters, USA)

Table 3. Gradient elution conditions for the separation of flavonoids

Time (min)	Flow (mL/min)	Acetonitrile (%)	0.1% acetic acid (%)
0		10	90
5.0		25	75
30.0	0.6	40	60
35.0		100	0
43.0		10	90

3) 감귤 정유의 추출 및 성분 분석

본 연구에서 사용된 용매들은 Merck의 제품을 사용하였다. 추출된 정유의 성분 분석은 7890A GC system (Agilent, USA) gas chromatography mass spectrometry detector (GC-MSD)를 사용하였다. 항산화 활성 검색에 사용된 electron spin resonance spectrometer (ESR)은 JES-FA200 (JEOL)을 사용하였으며, 항균 활성 검색에 사용된 배지는 Difco La. (Sparks, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다.

가. 온주, 하귤, 하밀감 및 신예감 정유의 추출

본 실험에 사용된 온주밀감, 하귤 및 신예감은 제주도 서귀포 감귤연구소 포장에서 과실을 채취하였고, 하밀감은 제주도 제주시 농가에 식재된 나무에서 수확하였다. 수확 시기는 2012년 11월부터 2013년 2월까지 각 품종 별로 완숙된 과실을 수확하였다. 수확 후 과피를 분리하여 증류정유추출장치(Figure 7)로 3시간 동안 추출한 후 갈색 병에 담아 4℃ 보관하여 실험에 사용하였다.



Figure 7. Picture of essential oil determination apparatus.

나. GC-MS 성분 분석

정유 성분은 gas chromatography mass spectrometry detector (GC/MSD)에 의하여 분석하였다. Column은 DB-1HT (0.1 μ m x 30 m x 0.32 mm, Agilent, USA), carrier gas는 He을 사용하여 유속 1.5 mL/min으로 하였다. 검출기 온도는 270 $^{\circ}$ C, 온도 프로그램은 40 $^{\circ}$ C에서 5분 유지하였고, 100 $^{\circ}$ C까지 5 $^{\circ}$ C/min 속도로 승온 시킨 후 100 $^{\circ}$ C에서 5분간 유지하였고, 230 $^{\circ}$ C까지 5 $^{\circ}$ C/min으로 승온 시킨 후 5분간 유지하였다. GC/MSD 분석은 GC와 동일한 조건에서 수행하였고, MSD의 온도는 312 $^{\circ}$ C로 유지하였다. GC system 및 mass spectrometry detector는 Agilent사의 7890A 및 5975C 모델을 사용하였고 GC/MSD에 의해 분석된 정유성분은 기기의 Wiley 138 database를 이용하여 해석하였다.

3. 생리활성 평가

1) 총 페놀함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Denis법³⁷을 이용하여 비색 정량 하였다. 추출물 100 μL 에 증류수 900 μL 를 넣어 total volume이 1 mL가 되도록 희석하였다. 여기에 Folin-Ciocalteus' phenol reagent 100 μL 를 첨가하여 실온에서 약 3분간 반응시키고, Na_2CO_3 용액 (7%, w/v) 200 μL 를 가하여 혼합한 후 증류수 700 μL 를 넣어 실온에서 1시간 반응시켰다. UV-Spectrophotometer를 이용하여 720 nm에서 흡광도 측정을 통해 분석되었으며, 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 표준물질로 하여 작성한 표준검정곡선을 통해 추출물의 총 폴리페놀 함량을 나타내었다.

2) 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Moreno 등의 방법³⁸을 이용하여 비색 정량 하였다. 추출물 15 μL 에 diethylene glycol 150 μL , 1N NaOH 15 μL 를 첨가하여 혼합한 후 상온에서 1시간 반응시키고 UV-Spectrophotometer를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 표준물질로 하여 작성한 표준검정곡선을 통해 추출물의 총 플라보노이드 함량을 나타내었다.

3) DPPH radical scavenging 활성 검색

항산화 활성은 변형된 Blois 등의 방법³⁹을 이용하여 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) free radical에 대한 전자공여능 (Electron donating ability, EDA)을 측정하였다. 추출물의 전자공여능 측정을 위해, 시료 20 μL 에 0.2 mM DPPH 용액 180 μL 를 넣고 10분간 반응시킨 후 UV-Spectrophotometer를 사용하여 잔존하는 DPPH free radical을 517 nm에서 측정하였다. DPPH

radical 소거활성은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

4) ABTS radical scavenging 활성 검색

ABTS radical 소거활성은 Pellegrini 등의 방법⁴⁰에 따라 측정하였다. ABTS radical 소거활성은 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 혼합 후 실온 암소에서 15시간 동안 방치하여 radical을 형성시킨 후 이 용액을 734 nm에서 흡광도 값이 0.70 ± 0.02 가 되도록 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 180 μ L에 추출물 20 μ L를 가하여 실온에서 15분 동안 방치한 다음 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS radical 소거활성은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

5) 세포 배양

염증 활성 실험에 사용된 murine macrophage cell line인 RAW264.7과 미백 활성 실험에 사용된 B16F10 murine melanoma cell은 Korean Cell Line Bank (KCLB)로부터 분양 받아 1% penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 3일에 한 번씩 계대 배양 하였다. Lipopoly-saccharide (LPS, E. coli serotype 0111:B4) 는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

6) Nitric oxide (NO) 측정

24 well plate에 RAW264.7 cell (1.5×10^5 cells/ml)을 18시간 전 배양 후, 시료와 LPS (1 μ g/ml)를 동시 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 nitric oxide (NO)의 양은 griess reagent (Sigma)를 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂⁻ 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 μ L와 griess

reagent 100 μ L를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) Pro-inflammatory cytokine 억제 활성 측정

RAW264.7 cell (1.5×10^5 cells/ml)을 24시간 배양 후, LPS를 1 μ g/ml로 처리하여 cytokine 생성을 자극하고 동시에 시료를 농도 별로 처리하였다. 24시간 배양 후 상등액을 취하여, 각각 mouse TNF- α (Invitrogen, USA), IL-1 β (R&D Systems, USA), IL-6 (Invitrogen, USA) 및 PGE₂ ELISA kit (R&D Systems, USA)를 사용하여 cytokine을 정량 하였다.

8) 미백 활성 측정

시료의 미백 활성을 측정하기 위하여 B16F10 murine melanoma 세포를 이용하여 melanogenesis 저해 효과를 측정하였다. 6 well plate에 5.0×10^4 cells/mL이 되도록 세포를 분주하고, 37 $^{\circ}$ C의 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양 후 배지를 제거하였다. Phosphate buffered saline (PBS)으로 세척하고 100 nM α -MSH를 포함하는 배지로 교환 후 sample을 농도별로 각각 첨가하여 3일간 배양하였다. 3일 동안 배양 후 배지를 제거하고 PBS buffer로 세척한 후 트립신으로 처리하여 세포를 회수하였다. 회수된 세포는 1M NaOH를 첨가하고 55 $^{\circ}$ C에서 2시간 방치하여 세포내의 melanin을 얻었다. 이는 micro plate reader기로 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9) 세포독성 평가(WST-1 assay)

세포독성 평가에는 RAW264.7 murine macrophage cell, B16F10 murine melanoma cell, HaCaT human keratinocyte cell이 사용되었다.

RAW264.7 세포는 1.5×10^5 cells/ml로 24 well plate에 18시간 전 배양하고 시료와 LPS (1 μ g/ml)를 동시 처리하여 24시간 배양한 후 세포독성을 측정하였다.

B16F10 세포는 5.0×10^4 cells/ml로 6 well plate에 18시간 전 배양하고 시료와 α -MSH (100 nM)을 동시 처리하여 3일간 배양한 후 세포독성을 측정하였으며, HaCaT human keratinocyte cell은 1.5×10^5 cells/ml로 24 well plate에 18시간 전 배양하고 시료를 처리하여 24시간 배양 후 세포 독성을 측정하였다.

각 시간별로 배양된 세포에 WST-1 reagent를 10%(v/v) 첨가하여 30분 동안 추가 배양하였으며 tetrazolium salts (WST-1)의 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시켜 440 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 실험은 3회 이상 반복하였으며 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하고, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 시료의 세포 독성 정도를 조사하였다.

모든 생리 활성 검색에는 microplate reader (Sunrise™, Tecan Co.) 또는 UV-Spectrophotometer (Molecular devices, SpectraMax M2, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 측정하였다.

10) Immunoblotting (iNOS, COX-2)

세포의 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현을 Western blot analysis로 확인하였다. RAW264.7 cell (1.5×10^5 cells/ml)을 18시간 전 배양 후, LPS (1 μ g/ml)와 시료를 농도별로 동시 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 세포를 PBS (phosphate buffered saline)로 세척하고 400 μ l의 lysis buffer (Pro-prep, Intron biotechnology, Gyeonggi-do, Korea)를 가하여 균질화 한 후, 14,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)를 표준용액으로 하여 Bradford reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)로 정량하였다. 동일한 양의 단백질(20 μ g/sample)을 SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)로 전기 영동 한 후, gel transfer device (iBlot®, Life technologies, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 PVDF membrane으로 단백질을 transfer하였다. 1차 항체인 NOS2, COX-2 및 β -actin과 2차 항체인 HRP가 결합된 anti-rabbit IgG는 모두 Santa Cruz Biotechnology사의 제품을 사용하였다. ECL 기질(West-zol, Intron biotechnology, Gyeonggi-do, Korea)과 반응 시킨 후, Chemidoc

(Fusion solo, VILBER LOURMAT, Deutschland, Germany)을 이용하여 각각의 단백질 발현 정도를 분석하였다.

11) ESR spectrometer를 이용한 항산화 활성

항산화 활성은 다양한 방법으로 측정되는데 electron spin resonance (ESR)법을 이용한 항산화 연구는 외국에서는 활발히 진행되고 있으나 국내에서는 식품 내에 함유된 중금속 측정 및 방사선 조사 검출 정도에 국한되어 사용되고 있다. ESR은 free radical을 측정할 수 있는 가장 민감하고 특이적이며 직접적인 방법으로 시료의 DPPH, superoxide anion 및 alkyl radical에 대한 소거능을 측정하였다.⁴¹⁻⁴³

가. ESR을 이용한 DPPH radical scavenging 활성 검색

시료의 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging 활성실험은 Nanjo 등의 방법을 이용하여 측정하였다.⁴⁴ 10 µL 시료용액에 90 µL DPPH 용액(0.2 mM)을 첨가하여 2분 동안 반응시키고, quartz capillary tube에 옮긴 후 electron spin resonance (ESR) spectrophotometer (JEOL Lts., Tokyo, Japan)로 측정하였다. 시료에 대한 radical 소거율(%)은 아래의 식을 이용하여 계산하였으며, ESR 분석 조건은 Table 4와 같았다.

$$\text{Activity (\%)} = \frac{\text{ESR signal intensity for medium containing the additives of concern}}{\text{ESR signal intensity for the control medium}} \times 100$$

Table 4. ESR spectroscopy conditions of the control factors of DPPH radical scavenging activity

Control factor	Condition
Frequency	9.4375 GHz
Magnetic field	337 mT
Power	1 mW
Modulation width	0.8 mT
Amplitude	500
Sweep width	10 mT
Scan time	0.5 min
Time constant	0.03 sec

나. ESR을 이용한 hydroxyl radical scavenging 활성 검색

10 mM 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO, in potassium phosphate buffer, pH 7.4), 5 mM 2,6-dihydroxypurin (xanthine), 0.25 U/mL xanthine oxidase, 그리고 각 시료들을 농도 별로 준비하여 실험을 수행하였다. Sample 10 μ L, DMPO 30 μ L, xanthine 30 μ L, xanthine oxidase 30 μ L를 넣고 25 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 반응시키고, quartz capillary tube에 옮긴 후 ESR spectrophotometer로 측정하였다. 시료에 대한 radical 소거율(%)은 아래의 식을 이용하여 계산하였으며, ESR 분석 조건은 Table 5와 같았다.

$$\text{Activity (\%)} = \frac{\text{ESR signal intensity for medium containing the additives of concern}}{\text{ESR signal intensity for the control medium}} \times 100$$

Table 5. ESR spectroscopy conditions of the control factors of Hydroxyl radical scavenging activity

Control factor	Condition
Frequency	9.4375 GHz
Magnetic field	337 mT
Power	5 mW
Modulation width	0.2 mT
Amplitude	700
Sweep width	10 mT
Scan time	0.5 min
Time constant	0.03 sec

다. ESR을 이용한 alkyl radical scavenging 활성 검색

40 mM 2,2-azobis(2-amidinopropane)hydrochloride (AAPH), 40 mM alpha (4-pyridyl-1-oxide)-N-*tert*-butylnitron (POBN)과 각 시료들을 농도 별로 준비하여 실험을 수행하였다. Sample 10 μ L, AAPH 45 μ L, POBN 45 μ L 37°C에서 10분 동안 반응시키고, quartz capillary tube에 옮긴 후 ESR spectrophotometer로 측정하였다. 시료에 대한 radical 소거율(%)은 아래의 식을 이용하여 계산하였으며, ESR 분석 조건은 Table 6과 같았다.

$$\text{Activity (\%)} = \frac{\text{ESR signal intensity for medium containing the additives of concern}}{\text{ESR signal intensity for the control medium}} \times 100$$

Table 6. ESR spectroscopy conditions of the control factors of alkyl radical scavenging activity

Control factor	Condition
Frequency	9.4375 GHz
Magnetic field	337 mT
Power	10 mW
Modulation width	0.2 mT
Amplitude	1,000
Sweep width	10 mT
Scan time	0.5 min
Time constant	0.03 sec

12) 항균 활성 평가

시료의 항균 활성을 측정하기 위해 *Propionibacterium acnes* 4종에 대하여 paper disc법으로 생육 억제율을 측정하였다. 0.8% agar를 포함하는 GAM 배지에 균을 0.5 MacFarland로 넣어 1.5 agar를 포함하는 각각의 배지 위에 붓고, 배지가 굳으면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm의 멸균된 paper disc를 올려 37℃에서 24-48시간 혐기 배양한 다음 디스크 주변에 형성된 inhibition zone의 직경(mm)을 측정하였다(Figure 8).

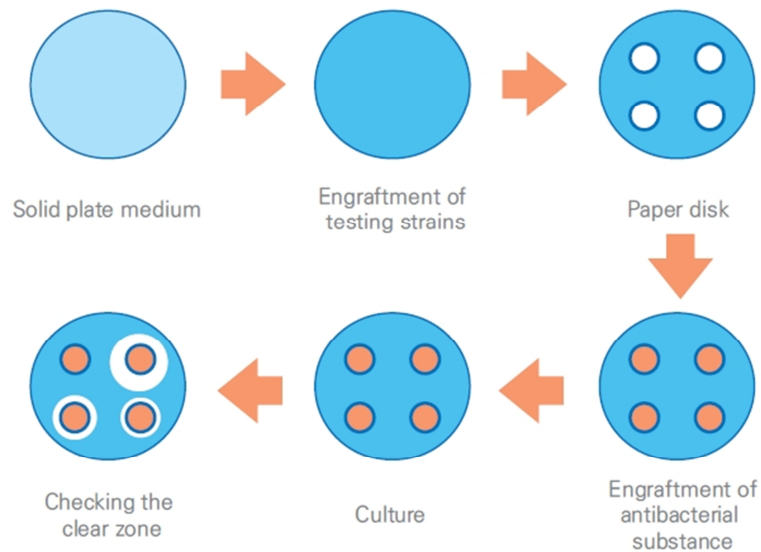


Figure 8. Paper disc diffusion test.

III. 결과 및 고찰

1. 부지화 미숙과 추출물의 유효 성분 분리 및 생리 활성 평가

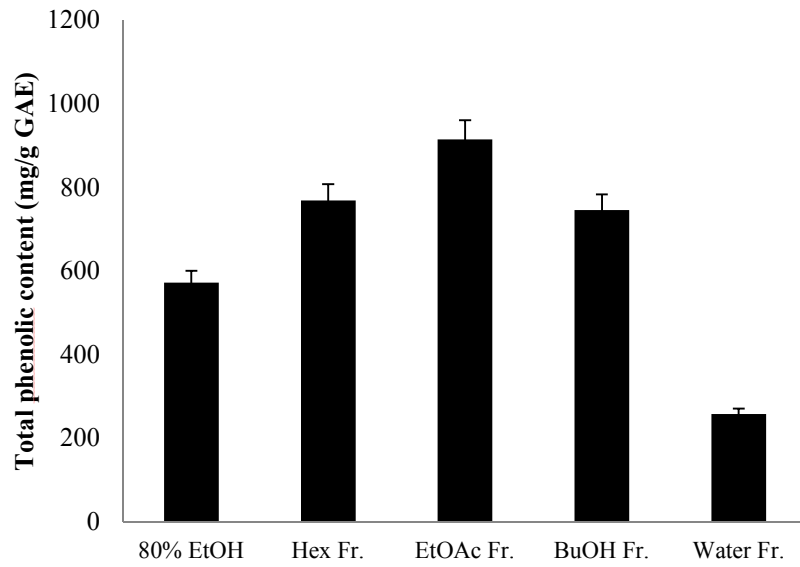
1) 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

Citrus 류의 과피나 종자에는 페놀산과 flavonoids와 같은 페놀화합물들이 많이 함유되어 있으며, 종자나 과육보다 과피에 더 많이 함유되어 있음이 보고되었다.⁴⁵ 페놀계 물질들은 식물체에 특수한 색깔을 부여하고, 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl (OH)기를 가진 방향족 화합물들을 가리키며, 플라보노이드와 탄닌이 주성분으로 충치예방, 고혈압 억제, 항에이즈, 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다.⁴⁶

시료를 추출하여 얻어진 추출물은 극성이 유사한 물질군(物質群)으로 나누는 조작을 분획(fractionation)이라 한다. 분획 방법으로는 주로 유기 용매를 이용하며, 이러한 용매 분획법은 서로 섞이지 않는 물과 유기 용매를 이용하여 순차적으로 분배 하는 방법이다. 이 때 *n*-hexane 층에는 극성이 거의 없는 지질, 색소 등이 분리되어 나오고, ethyl acetate 층에서는 flavonoid, alkaloid 등의 적당한 극성 물질이 얻어진다. *n*-BuOH 층에서는 더욱 극성이 큰 물질인 배당체 등이 추출되어 나오고, 남아있는 물 층(잔사, residue)에서는 극성이 매우 큰 당, 아미노산 등이 용해되어 있게 된다.⁴⁷

Gallic acid와 quercetin을 표준용액으로 사용한 검정곡선을 작성하여 부지화 미숙과 과피 (SIFP; Shiranuhi Immature Fruit Peel) 80% EtOH 추출물과 용매분획물에 함유된 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 Figure 9와 같다. 추출물 및 분획물의 중량 g 당 함유하고 있는 gallic acid와 quercetin의 양으로 환산하여 Figure 10에 나타내었다. 그 결과, EtOAc 분획물에서 가장 많은 폴리페놀(915.2 mg/g GAE) 및 플라보노이드(202.3 mg/g QE)를 함유하고 있었으며, 이는 항산화, 항염 등의 생리 활성 실험 결과와도 관련이 있을 것이라 예상하였다.

(A)



(B)

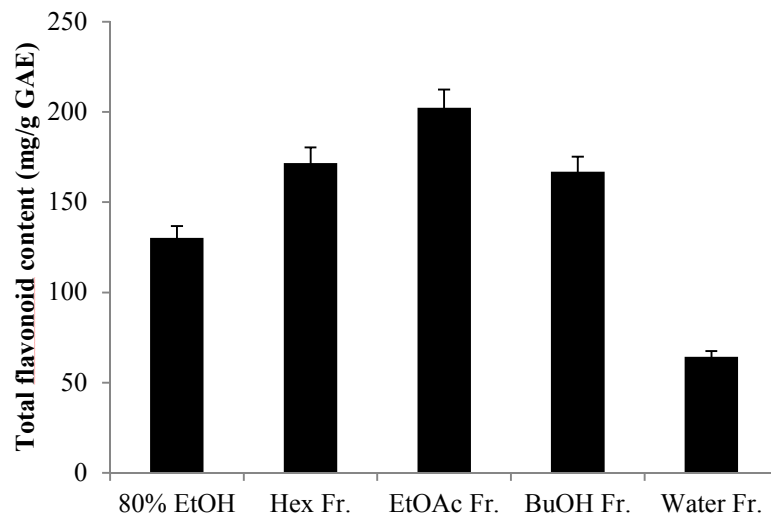
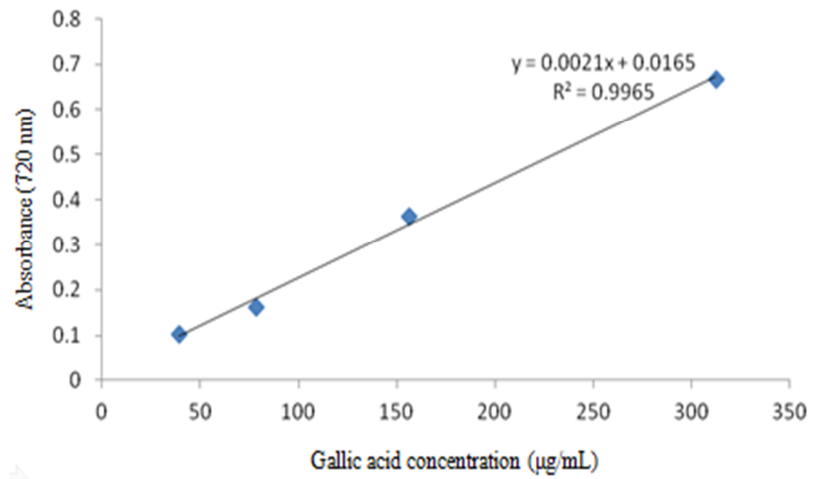


Figure 9. Total phenolic compound (A) and flavonoid (B) content of extract and solvent layers from SIFP. Values are expressed as mean \pm SD (n=3).

(A)



(B)

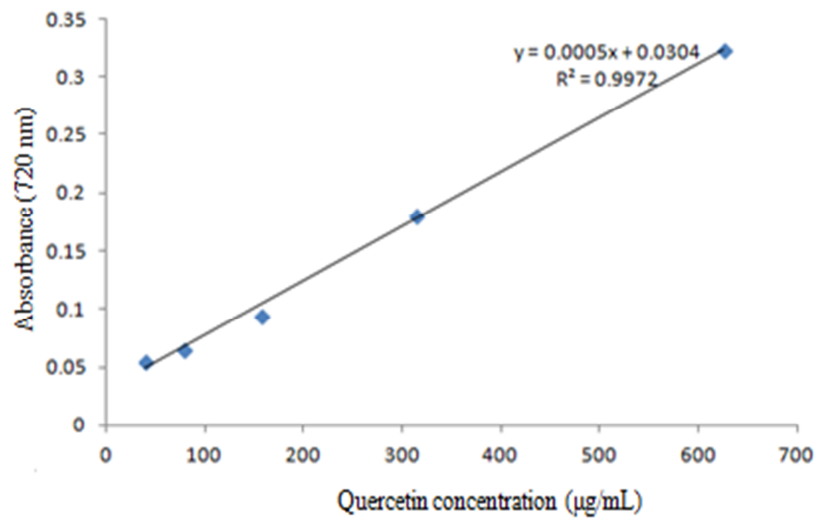


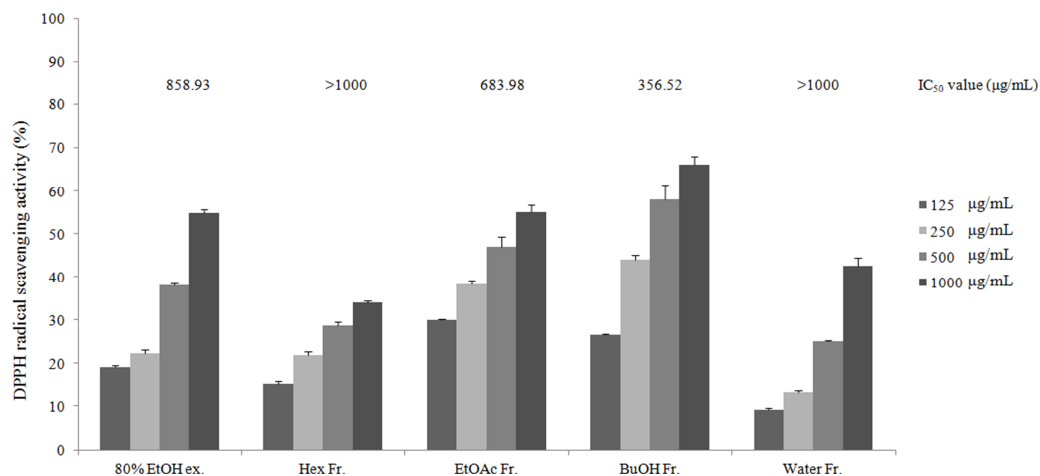
Figure 10. Calibration curve for quantification of total phenolic compound content and flavonoid content (A; gallic acid, B; quercetin).

2) DPPH radical scavenging 활성 검색

항산화 활성을 측정하는 방법에는 여러 가지가 있으나 DPPH 라디칼 소거활성은 비교적 간단하면서 대량으로 측정이 가능한 항산화 측정법이다. DPPH는 라디칼 중 비교적 안정한 화합물로 황 함유 아미노산, ascorbic acid, 페놀성 화합물 등의 항산화 물질로부터 전자나 수소를 제공받아 DPPH-H로 환원되면서 자색이 탈색되는 원리를 이용하여 항산화 활성을 간단히 측정할 수 있는 동시에 식물체의 항산화 활성과도 연관성이 매우 높기 때문에 많이 이용되고 있는 방법이다.⁴⁸ 부지화 미숙과 과피(SIFP)의 80% EtOH 추출물 및 용매 분획물에 대하여 DPPH radical scavenging 활성을 측정한 결과 물 분획물($IC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$)과 *n*-Hex 분획물($IC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$)을 제외한 80% EtOH 추출물($IC_{50} = 858.93 \mu\text{g/mL}$), EtOAc 분획물($IC_{50} = 683.98 \mu\text{g/mL}$) 및 *n*-BuOH 분획물($IC_{50} = 356.52 \mu\text{g/mL}$)에서 농도의존적으로 DPPH radical scavenging 활성을 보였다(Figure 11).

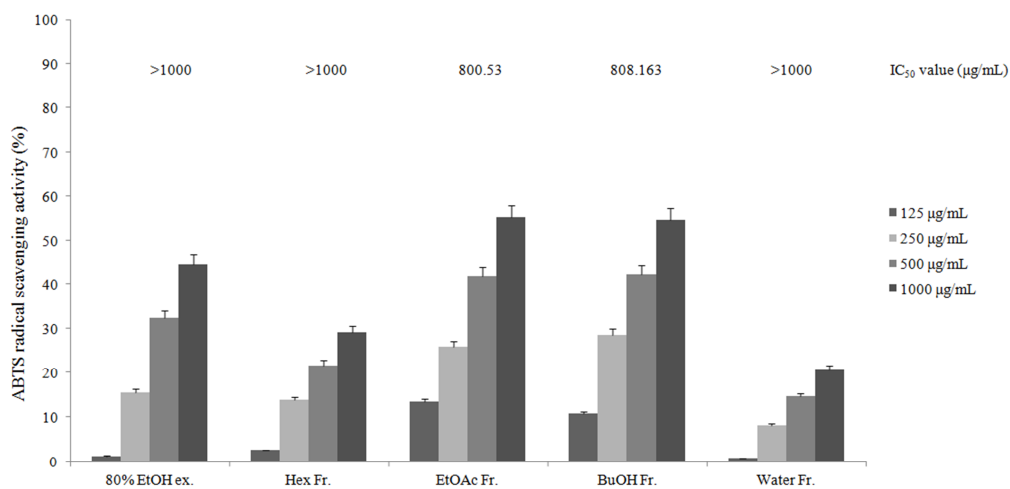
3) ABTS radical scavenging 활성 검색

부지화 미숙과 과피(SIFP)의 80% EtOH 추출물 및 용매 분획물에 대하여 ABTS radical scavenging 활성을 측정하였다. 그 결과 80% EtOH 추출물, *n*-Hex 분획물 및 Water 분획물은 SC_{50} 값이 $1000 \mu\text{g/mL}$ 보다 높게 나타났으며, EtOAc 분획물($SC_{50} = 800.53 \mu\text{g/mL}$) 및 *n*-BuOH 분획물($SC_{50} = 808.16 \mu\text{g/mL}$)에서 좋은 ABTS radical scavenging 활성을 보였다(Figure 12).



* Positive control (IC₅₀) : BHT (22.19 µg/mL), Quercetin (25.48 µg/mL)

Figure 11. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent fractions from SIFP. Data are expressed as a percentage of control and are expressed as mean \pm SD (n=3).



* Positive control (IC₅₀) : BHT (23.01 µg/mL), Quercetin (22.50 µg/mL)

Figure 12. ABTS radical scavenging activities of extract and solvent fractions from SIFP. Data are expressed as a percentage of control and are expressed as mean \pm SD (n=3).

4) Nitric oxide (NO) 억제 활성 및 세포 독성 측정

부지화 미숙과 과피 80% EtOH 추출물 및 분획물에 대해 농도별로 nitric oxide production을 확인한 결과, 80% EtOH 추출물에서는 nitric oxide의 억제를 확인할 수 없었지만 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 농도의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 세포 독성 측정 결과 *n*-Hex 분획물에서 농도가 높아질수록 세포 독성이 나타남을 확인하였고 EtOAc 분획물에서는 100 µg/mL 농도에서 20%정도의 세포 독성을 보였으나 nitric oxide를 80% 이상 크게 감소시키는 것을 확인함에 따라 EtOAc 분획물을 타겟으로 하여 유효 성분 분리 및 추가적인 활성 실험을 진행하였다(Figure 13).

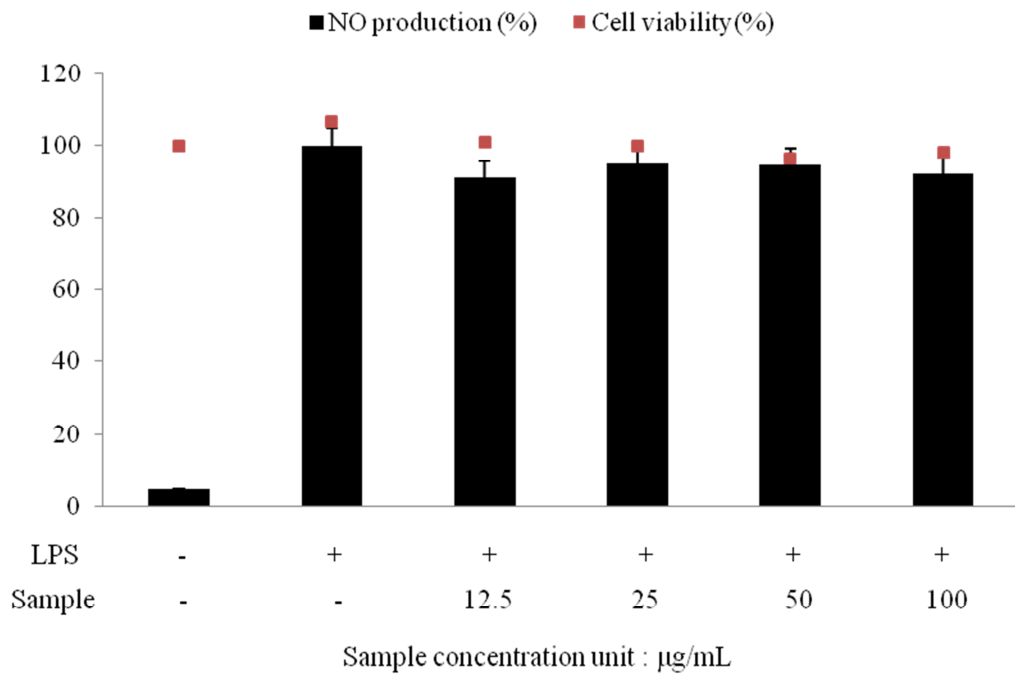


Figure 13. Inhibitory effects of extract from SIFP on nitric oxide (NO) production and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 murine macrophage cell line. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

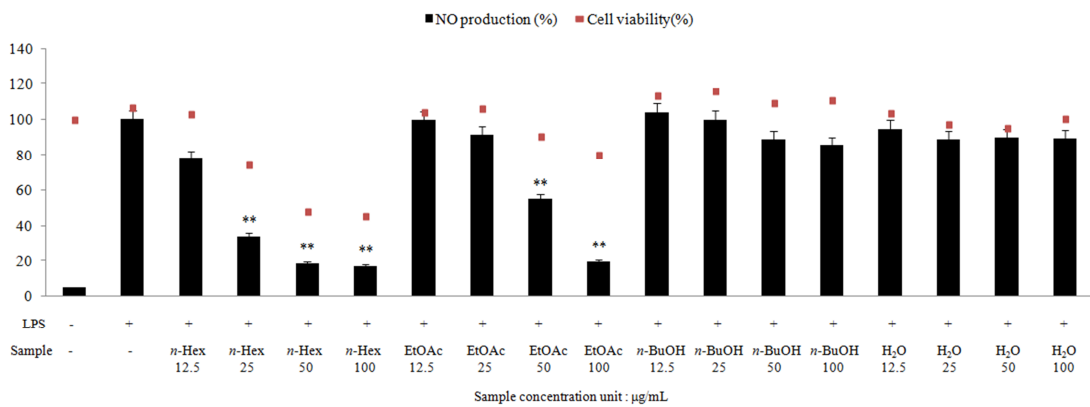


Figure 14. Inhibitory effects of solvent fraction from SIFP on nitric oxide (NO) production and cell viability in LPS-stimulated RAW264.7 murine macrophage cell line. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

5) Pro-inflammatory cytokine 억제 활성 측정

LPS로 유도된 대식세포는 pro-inflammatory cytokine을 분비하게 되는데 이를 통하여 염증 반응의 정도를 알아볼 수 있다. 부지화 미숙과 과피 EtOAc 분획물에서 이러한 cytokine들을 얼마나 억제할 수 있는지 확인하기 위하여 4가지 cytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 PGE₂)에 대해 세포 배양액을 이용하여 ELISA 방법으로 측정하였다. 그 결과 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 TNF- α 생성량은 약 30%정도 억제되었고, IL-1 β 는 약 36%, IL-6는 약 23%가 억제되었음을 확인하였다. 그러나 PGE₂의 경우 약 8% 정도 억제되었지만 농도별로 큰 차이가 없음을 확인하였다(Figure 15-18).

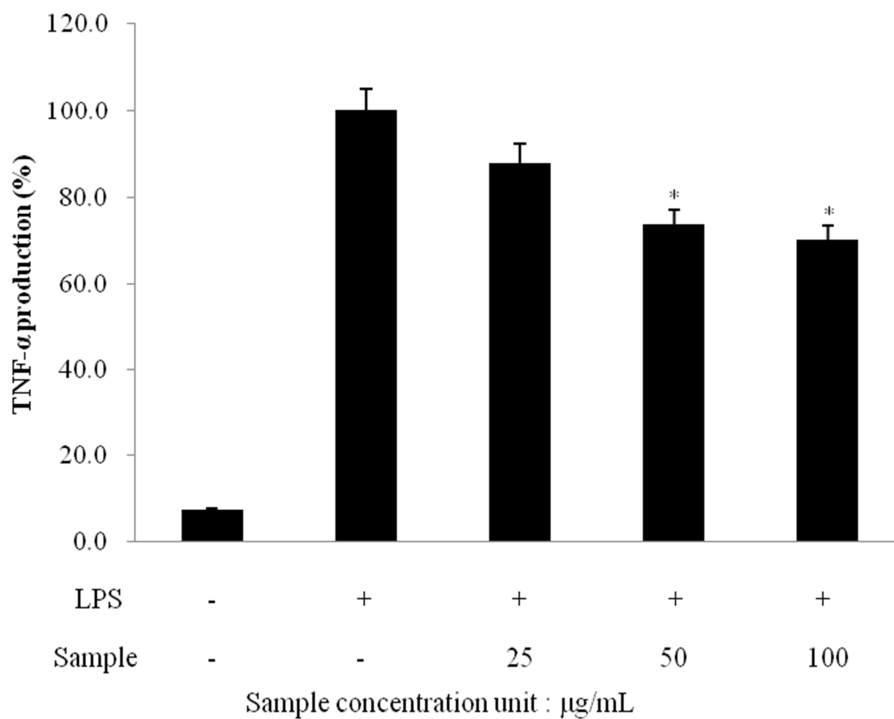


Figure 15. TNF- α production of EtOAc fraction from SIFP. RAW264.7 cells were stimulated with or without lipopolysaccharide (LPS) and the supernatants were harvested for TNF- α measurements after 24 hr. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, versus LPS alone.

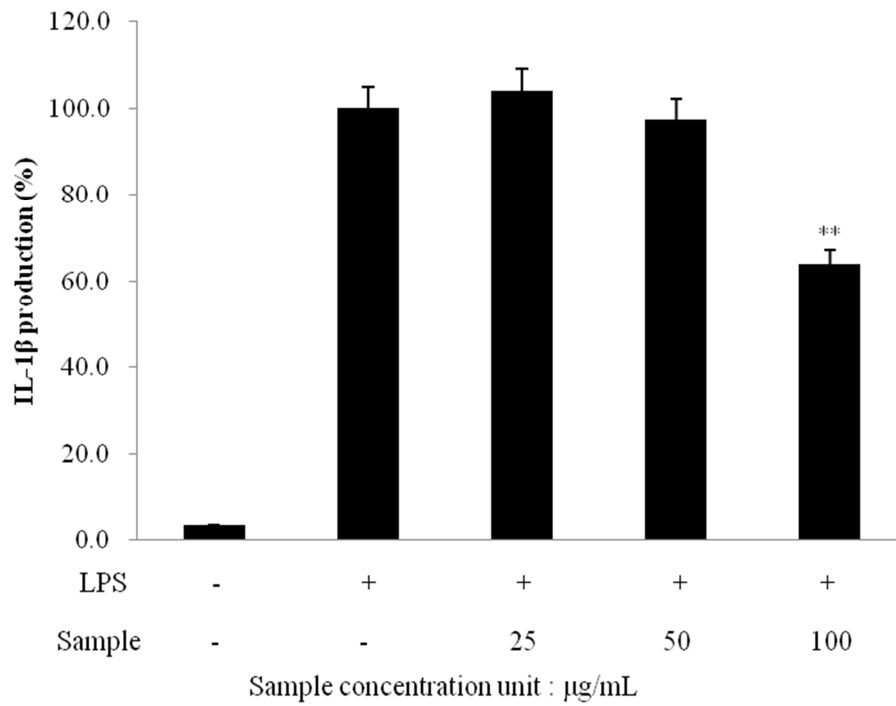


Figure 16. IL-1 β production of EtOAc fraction from SIFP. RAW264.7 cells were stimulated with or without lipopolysaccharide (LPS) and the supernatants were harvested for IL-1 β measurements after 24 hr. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, versus LPS alone.

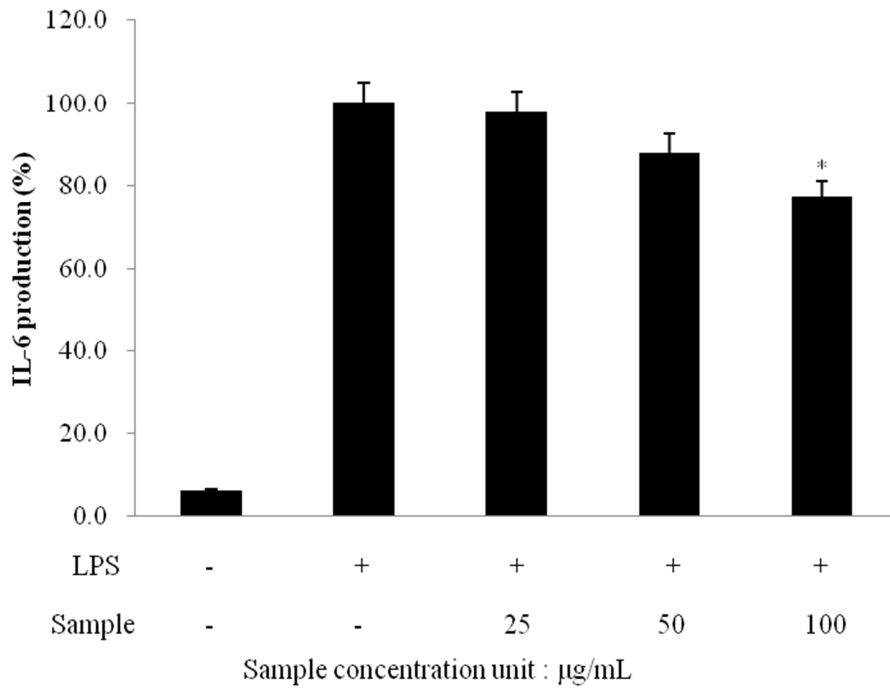


Figure 17. IL-6 production of EtOAc fraction from SIFP. RAW264.7 cells were stimulated with or without lipopolysaccharide (LPS) and the supernatants were harvested for IL-6 measurements after 24 hr. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, versus LPS alone.

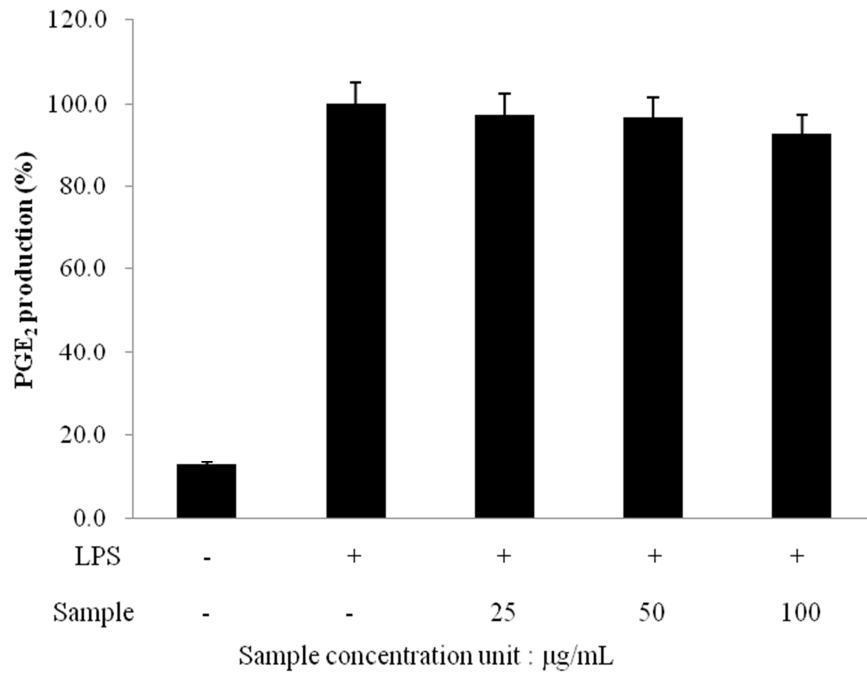
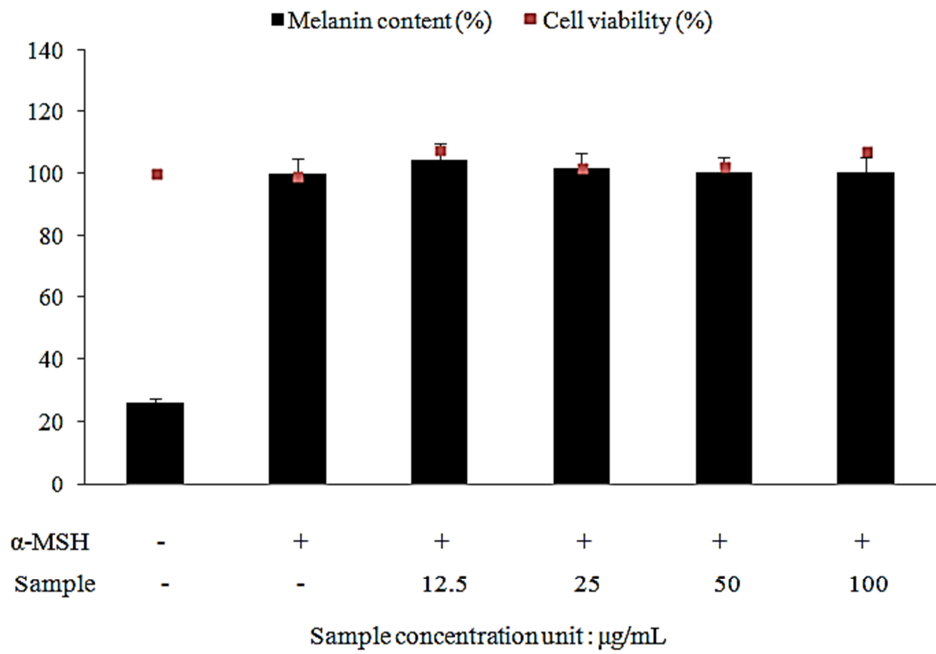


Figure 18. PGE₂ production of EtOAc fraction from SIFP. RAW264.7 cells were stimulated with or without lipopolysaccharide (LPS) and the supernatants were harvested for PGE₂ measurements after 24 hr. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, versus LPS alone.

6) 미백 활성 측정

α -MSH로 멜라닌 생성이 유도된 B16F10 murine melanoma cell에서 시료에 의해 멜라닌 생성이 얼마나 억제되는지 확인하였다. 80% EtOH 추출물에서는 멜라닌 저해 활성이 나타나지 않았다(Figure 19A). 용매 분획물에서는 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 멜라닌 생성을 현저히 억제하는 것을 확인하였다. 그러나 *n*-Hex 분획물 및 EtOAc 분획물 고농도(100 μ g/mL)에서 세포 독성을 나타낸 것으로 보아 EtOAc 분획물 50 μ g/mL 이하의 농도에서는 세포 독성 없이 유의적인 활성을 나타내었다고 판단하였고 EtOAc 분획물에 미백활성을 나타내는 유효 성분이 함유되어 있을 것이라 예상하였다(Figure 19B).

(A)



(B)

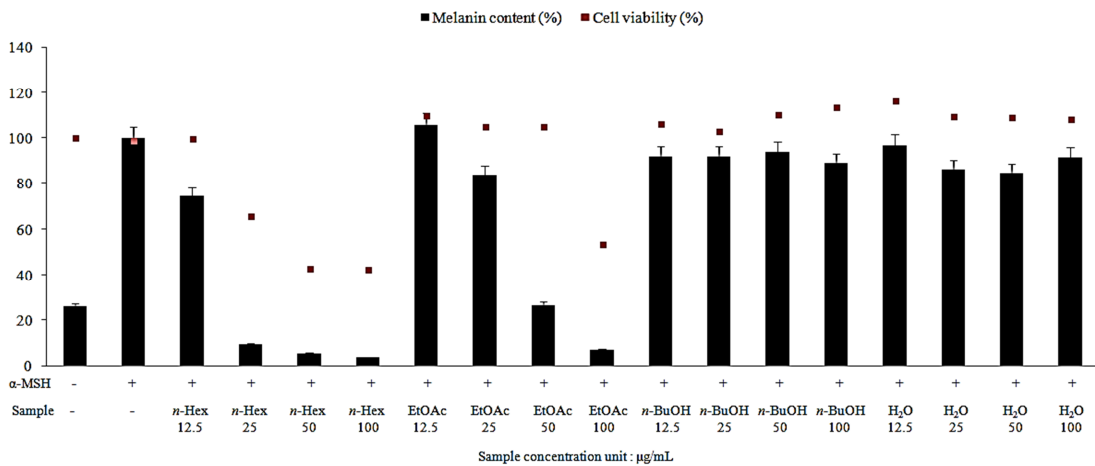
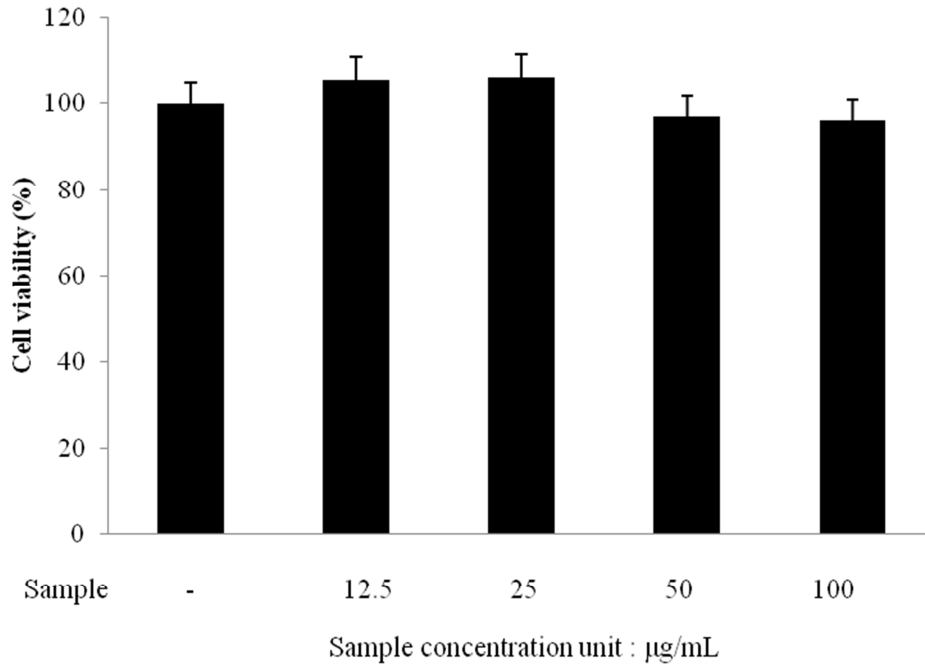


Figure 19. Melanin contents and cell viability of extract (A) and solvent fraction (B) from SIFP in α -MSH stimulated B16F10 murine macrophage cell line. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

7) HaCaT human keratinocyte cell에 대한 독성 평가

인간각질형성세포(HaCaT human keratinocyte)에서 시료에 의한 세포 독성을 확인하기 위하여 WST-1 assay를 실시하였다. 세포 내의 미토콘드리아 탈수소효소에 의해 tetrazolium salt가 formazan으로 환원되며 세포 생존율을 측정하는 시험방법이다. 시료를 농도별로 HaCaT cell에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 시료 무처리 대조군의 세포생존율을 100% 기준으로 하였고 80% EtOH 추출물 및 용매 분획물의 처리 시 세포 생존율을 측정하였다. 측정 결과 *n*-Hex 분획물에서 농도가 높아질수록 세포에 대한 독성이 나타남을 확인하였고 100 µg/mL 농도에서 20%이상 독성을 나타냈다. *n*-Hex 분획물을 제외하고 80% EtOH 추출물, EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O 분획물에서는 세포 독성이 거의 없음을 확인하였다(Figure 20).

(A)



(B)

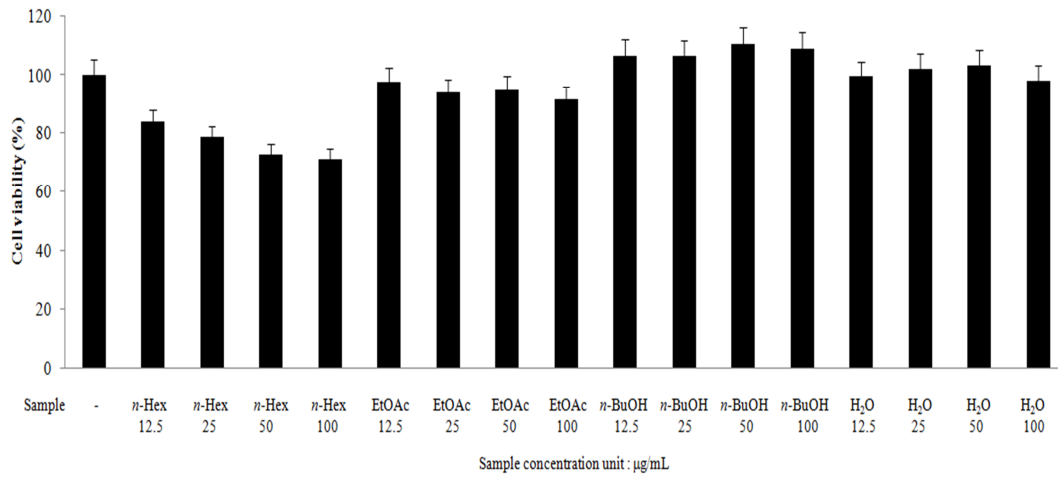


Figure 20. Cell viability of extract (A) and solvent fraction (B) from SIFP in HaCaT human keratinocyte cell line. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

8) 부지화 미숙과 과피 EtOAc 분획물에서 분리된 화합물의 구조결정

MPLC를 이용하여 compound 1,2,3 및 4를 분리하였다(Figure 21). 분리된 compound들은 1D, 2D NMR을 이용하여 화합물을 예측하였고, 문헌^{49,50}과 대조하여 동정하였다(Table 7-10).

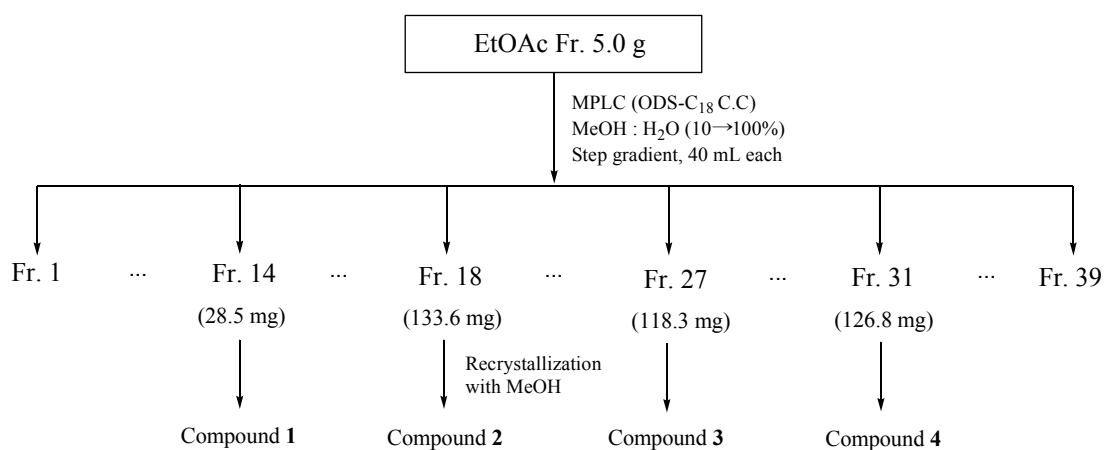


Figure 21. Procedure of isolation of compounds from SIFP.

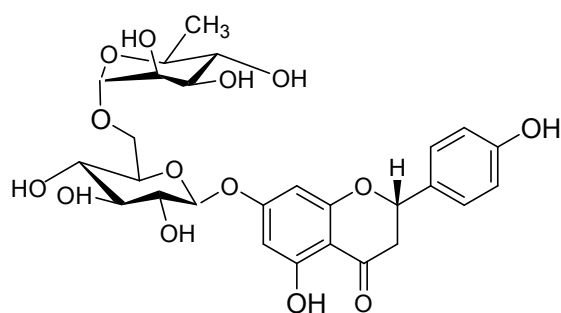


Table 7. NMR spectroscopic data^{a)} for compound 1

Position	δ_c
2	80.7
3	40.5
4	198.6
5	165.1
6	98.0
7	166.9
8	97.2
9	164.6
10	105.1
1'	129.3
2'	129.2
3'	116.5
4'	159.2
5'	116.5
6'	130.9
Glu-1	102.2
Glu-2	74.7
Glu-3	77.9
Glu-4	71.3
Glu-5	77.2
Glu-6	67.4
Rhm-1	101.2
Rhm-2	72.1
Rhm-3	72.4
Rhm-4	74.2
Rhm-5	69.9
Rhm-6	18.1

^{a)} ¹H, ¹³C NMR spectra were recorded in CD₃OD solution at 500 MHz, respectively

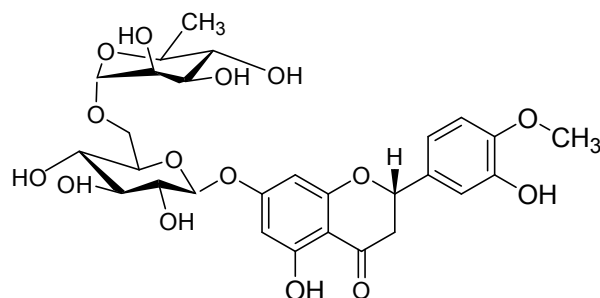


Table 8. NMR spectroscopic data^{a)} for compound 2

Position	δ_C
2	78.3
3	42.1
4	197.0
5	163.0
6	96.3
7	165.1
8	95.5
9	162.5
10	103.3
1'	130.9
2'	114.1
3'	146.4
4'	148.0
5'	112.0
6'	117.9
Glu-1	100.6
Glu-2	73.0
Glu-3	76.3
Glu-4	69.6
Glu-5	75.5
Glu-6	66.0
Rhm-1	99.4
Rhm-2	70.3
Rhm-3	70.7
Rhm-4	72.1
Rhm-5	68.3
Rhm-6	17.8
OCH ₃	55.7

^{a)} ¹H, ¹³C NMR spectra were recorded in DMSO solution at 500 MHz, respectively

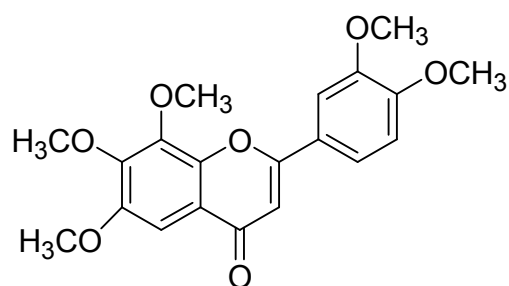


Table 9. NMR spectroscopic data^{a)} for compound **3**

Position	δ_C
2	160.3
3	106.4
4	175.7
5	97.3
6	139.7
7	157.4
8	151.5
9	154.0
10	111.6
1'	123.1
2'	109.1
3'	149.0
4'	151.7
5'	112.0
6'	119.4
6-OCH ₃	55.7
7-OCH ₃	61.8
8-OCH ₃	55.9
3'-OCH ₃	61.0
4'-OCH ₃	56.4

^{a)} ¹H, ¹³C NMR spectra were recorded in DMSO solution at 500 MHz, respectively.

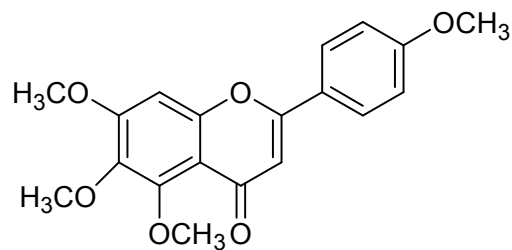
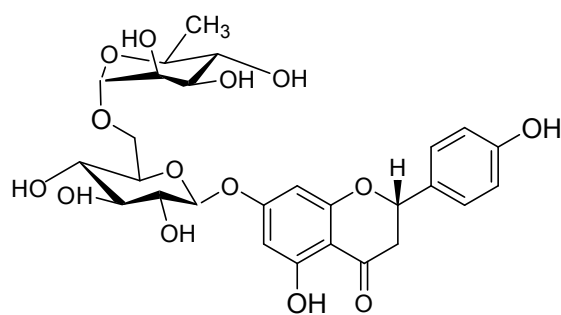


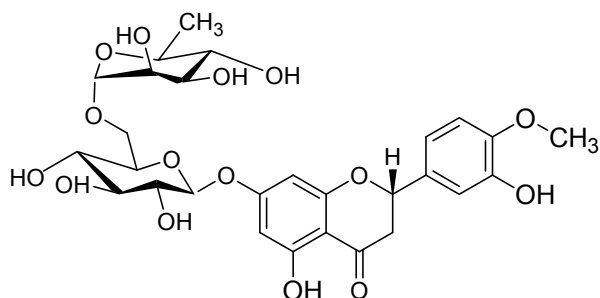
Table 10. NMR spectroscopic data^{a)} for compound **4**

Position	δ_c
2	162.1
3	106.7
4	177.0
5	154.4
6	140.3
7	157.7
8	96.2
9	152.4
10	112.6
1'	123.6
2',6'	127.6
3',5'	114.3
4'	161.4
5-CH ₃	62.1
6-CH ₃	61.5
7-OCH ₃	56.2
4'-OCH ₃	55.4

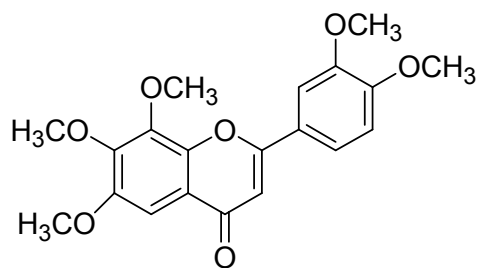
^{a)} ¹H, ¹³C NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at 500 MHz, respectively.



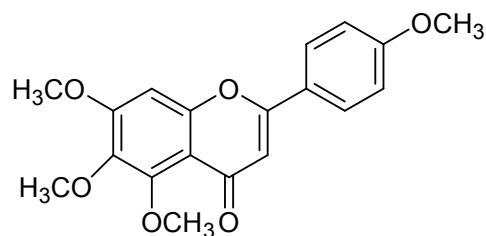
Narirutin (1)



Hesperidin (2)



6,7,8,3',4'-pentamethoxyflavone (3)



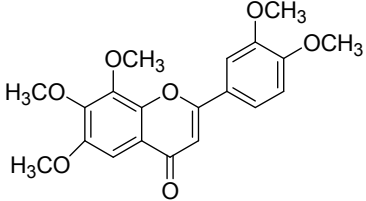
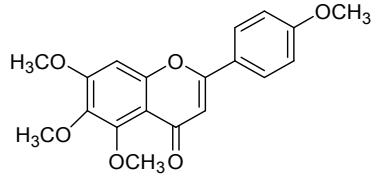
5,6,7,4'-Tetramethoxyflavone (Tetramethyl-*O*-scutellarein, 4)

Figure 22. Structures of isolated compounds from SIFP.

9) 분리된 화합물의 생리활성 평가

부지화 미숙과 과피에서 분리된 화합물 4가지 중 비교적 알려지지 않은 두 가지 화합물(compound 3, 4)에 대하여 항산화, 항염 및 미백활성 평가를 수행하였다. 이 두 화합물은 polymethoxyflavone (PMF)류로 구분되는 화합물로서 다음과 같은 구조를 가지고 있다(Table 11).

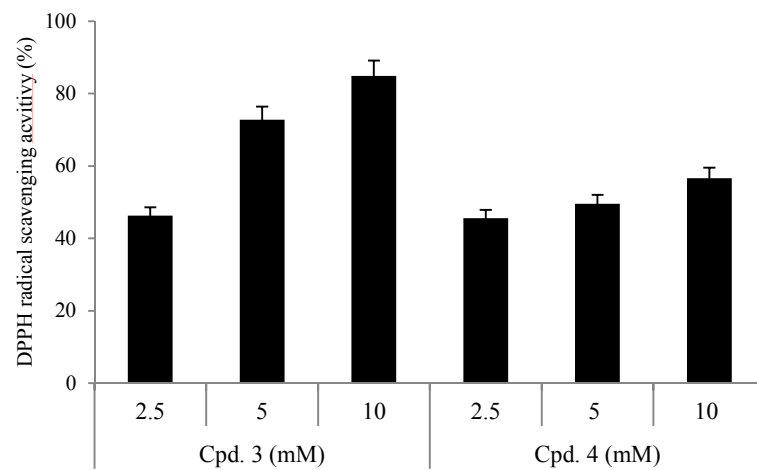
Table 11. Structure of isolated compounds from SIFP

	Compound 3	Compound 4
Chemical structure		
Chemical name	6,7,8,3',4'-pentamethoxyflavone	Tetramethyl- <i>O</i> -scutellarin (5,6,7,4'-Tetramethoxyflavone)
Molecular Weight	372.37 (C ₂₀ H ₂₀ O ₇)	342.34 (C ₁₉ H ₁₈ O ₆)

10) 분리된 화합물의 항산화 활성

분리된 화합물 compound 3, 4에 대하여 DPPH 및 ABTS radical 소거활성을 측정된 결과 농도의존적으로 각 radical을 소거하는 활성을 보였다. DPPH radical의 경우 compound 4보다 compound 3에서 좋은 활성을 보였으며 IC₅₀ 값은 2.85 mM (compound 3) 및 5.32 mM (compound 4)로 나타났다(Figure 23A). ABTS radical은 반대로 compound 3보다 compound 4에서 좋은 활성을 나타냈으며, 두 화합물은 DPPH radical 보다 ABTS radical에 대해 현저히 좋은 활성을 보였으며 IC₅₀ 값은 0.66 mM (compound 3) 및 0.30 mM (compound 4)로 확인되었다(Figure 23B).

(A)



(B)

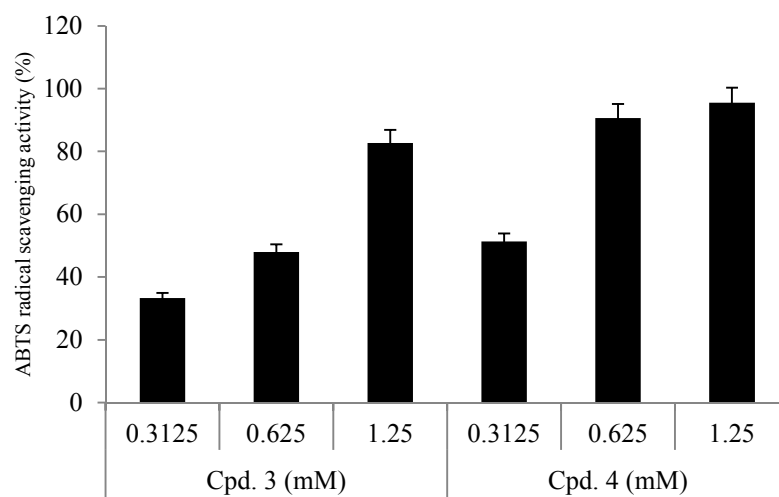


Figure 23. DPPH (A) and ABTS (B) radical scavenging activities of compound **3** and **4**. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

11) 분리된 화합물의 세포 독성 및 nitric oxide (NO) 저해 활성

분리된 화합물의 세포 독성을 측정하기 위해 RAW264.7 macrophage의 세포 생존율을 WST-1 assay로 분석하였다. WST-1 분석은 세포 내의 미토콘드리아 탈수소효소에 의해 tetrazolium salt가 formazan으로 환원되며 세포생존율을 측정하는 시험 방법이다. LPS로 자극된 RAW264.7 cell에 시료를 농도별로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 시료 무처리 대조군의 세포 생존율을 100% 기준으로 하였고 compound 3 및 4를 농도별로 처리하였을 때의 세포 생존율을 측정하였다. 측정결과 compound 3 및 4에서 100 μ M 농도까지 세포 독성이 나타나지 않음을 확인하였다.

Nitric oxide (NO)는 free radical인 활성질소종(Reactive Nitrogen Species: RNS)의 일종으로 NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine이 citrulline으로 산화될 때 발생하는 반응성이 매우 높은 것으로 알려져 있다, 정상적인 농도로 존재하는 NO는 심혈관계와 신경계 및 면역계의 전달 물질로서 신경전달물질을 운반하거나 종양을 억제하는 작용, 감염성 병원체에 대한 억제 등 매우 다양한 기능을 가지는 물질로 알려져 있다. 그러나 과도하게 발현된 NO는 독성 radical로 작용하여 인체에 유해한 영향을 주는 세포손상뿐만 아니라 염증 반응을 비롯한 뇌막염, 알츠하이머병과 파킨슨병 같은 퇴행성 질환에 중요한 요인으로 작용하는 것으로 보고되어 있다.⁵¹ Lipopolysaccharide (LPS)로 세포를 자극시키고 시료를 처리하여 NO 생성에 미치는 영향을 조사한 결과 compound 3은 NO 생성 억제 효과가 나타나지 않았다. 하지만 compound 4에서 농도의존적으로 NO 생성을 억제하였으며 100 μ M 농도에서 세포독성 없이 60% 이상 NO 생성을 억제하는 것을 확인하였다(Figure 24).

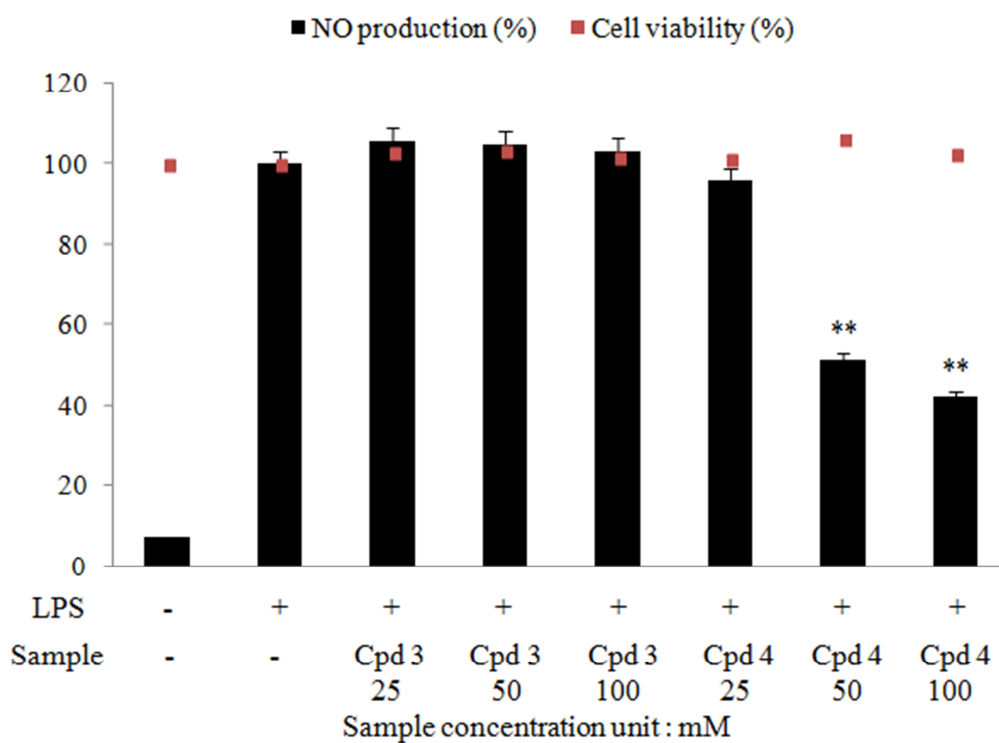


Figure 24. Cell viability and inhibitory effects of compound **3** and **4** from SIFP on the production of nitric oxide (NO) in LPS-stimulated RAW264.7 murine macrophage cell line. LPS (-); saline without LPS, LPS (+); lipopolysaccharide without extract, Cpd **3**; compound **3** (6,7,8,3',4'-pentamethoxyflavone), Cpd **4**; compound **4** (tetramethyl-*O*-scutellarin). The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

12) Compound 4의 pro-inflammatory cytokine 저해활성

LPS로 유도된 대식세포는 pro-inflammatory cytokine을 분비하게 되는데 이를 통하여 염증 반응의 정도를 알아볼 수 있다. 분리된 화합물 두 가지 중 nitric oxide (NO) 저해 활성이 좋았던 compound 4에서 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 PGE₂를 얼마나 저해하는지 확인하기 위하여 세포 배양액을 이용하여 ELISA 방법으로 측정하였다.

RAW264.7 cell에서 compound 4는 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 PGE₂의 생성을 농도의존적으로 억제하며 좋은 활성을 나타냈으며, 특히 100 μ M 농도에서 IL-6는 약 80%, PGE₂는 약 90% 이상 유의적으로 억제하는 활성을 나타내었다(Figure 25-28).

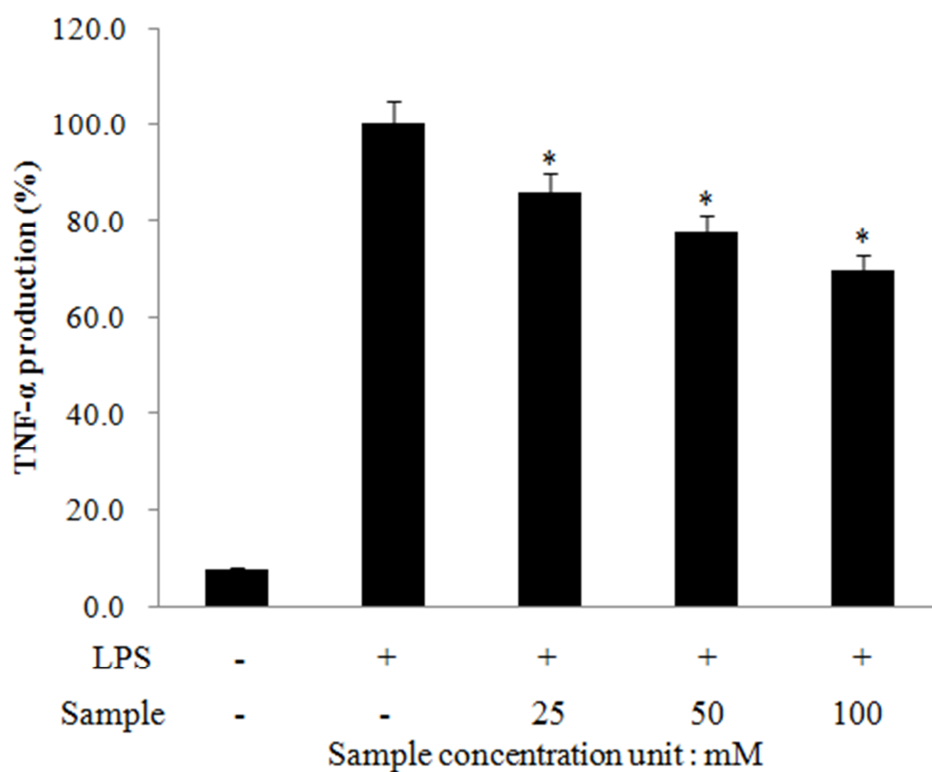


Figure 25. TNF- α production of compound **4** (tetramethyl-*O*-scutellarin) from SIFP in LPS-stimulated RAW264.7 murine macrophage cell line. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, versus LPS alone.

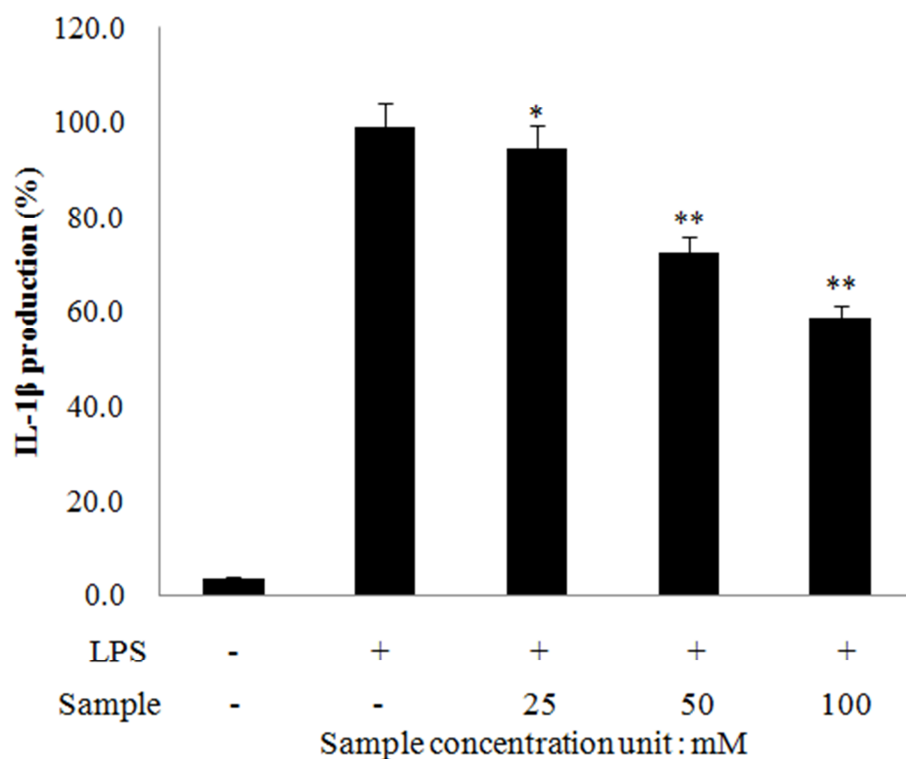


Figure 26. IL-1 β production of compound 4 (tetramethyl-*O*-scutellarin) from SIFP in LPS-stimulated RAW264.7 murine macrophage cell line. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, versus LPS alone.

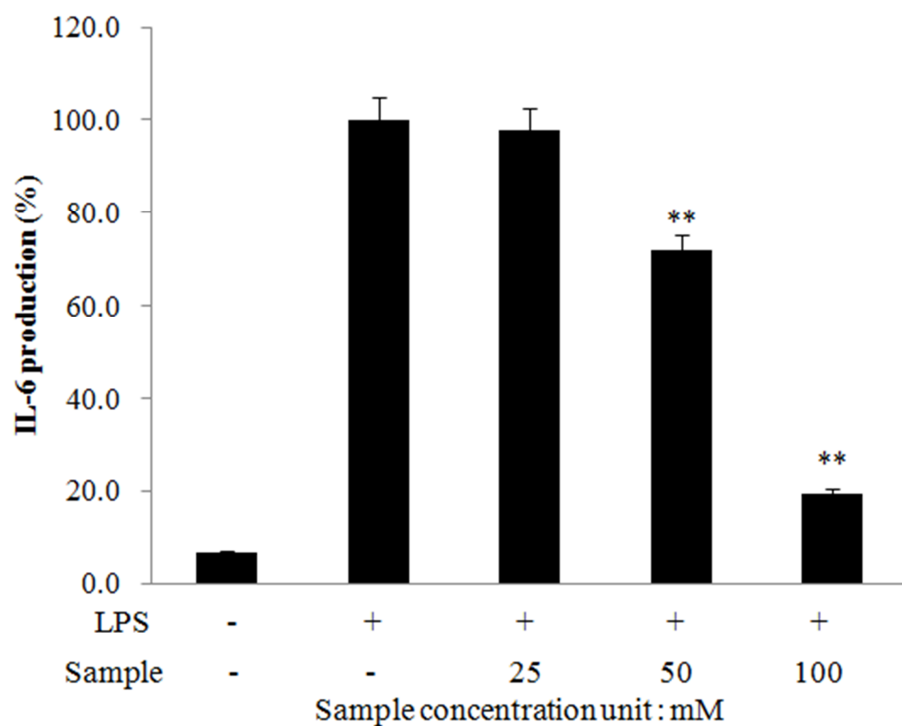


Figure 27. IL-6 production of compound 4 (tetramethyl-*O*-scutellarin) from SIFP in LPS-stimulated RAW264.7 murine macrophage cell line. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, versus LPS alone.

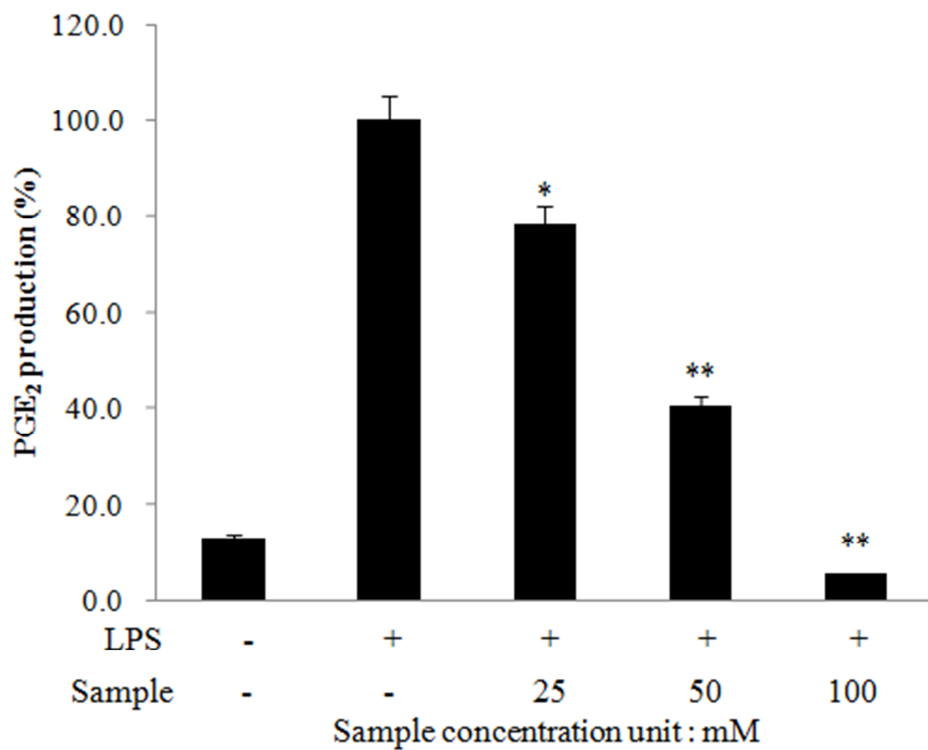


Figure 28. PGE₂ production of compound 4 (tetramethyl-*O*-scutellarin) from SIFP in LPS-stimulated RAW264.7 murine macrophage cell line. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, versus LPS alone.

13) 분리된 화합물의 미백 활성

분리된 화합물의 세포 독성을 측정하기 위해 B16F10 murine melanoma cell에서의 시료농도 별 세포 생존율을 WST-1 assay로 분석하였다. WST-1 분석은 세포 내의 미토콘드리아 탈수소효소에 의해 tetrazolium salt가 formazan으로 환원되며 세포 생존율을 측정하는 시험 방법이다. α -MSH로 B16F10 melanoma cell에 melanin 생성을 유도시키고 시료를 농도별로 처리하여 3일간 배양하였다. 시료 무처리 대조군의 세포생존율을 100% 기준으로 하였고 compound 3 및 compound 4를 농도별로 처리하였을 때의 세포 생존율을 측정하였다. 측정결과 compound 3 은 100 μ M 농도까지 세포 독성이 나타나지 않았지만 compound 4의 경우 100 μ M 농도에서 약 40% 세포 독성이 있음을 확인하였다.

분리된 화합물 compound 3 및 compound 4의 미백 활성을 확인하기 위하여 α -MSH로 멜라닌 생성이 유도된 B16F10 murine melanoma cell에 compound 3과 compound 4를 각각 25, 50, 100 μ M로 처리하여 3일간 배양하였다. 배양 후 시료에 의한 멜라닌 생성량을 측정한 결과 compound 4에서 농도의존적으로 melanin 생성을 억제하였고 50 μ M에서는 약 60% 이상의 멜라닌 저해 활성을 확인하였다. 하지만 100 μ M 농도에서는 세포 독성이 나타난 것으로 보아 50 μ M 이하 농도 범위에서 미백 효능이 있다고 판단하였다. 또한 compound 3의 경우 농도가 증가할수록 멜라닌 생성이 증가하는 것으로 보아 흰머리 방지 소재로써의 활용 가능성이 있을 것으로 판단되며 추후 기전연구를 통해 compound 3, 4에 대한 효능 검증이 필요하다고 사료된다(Figure 29).

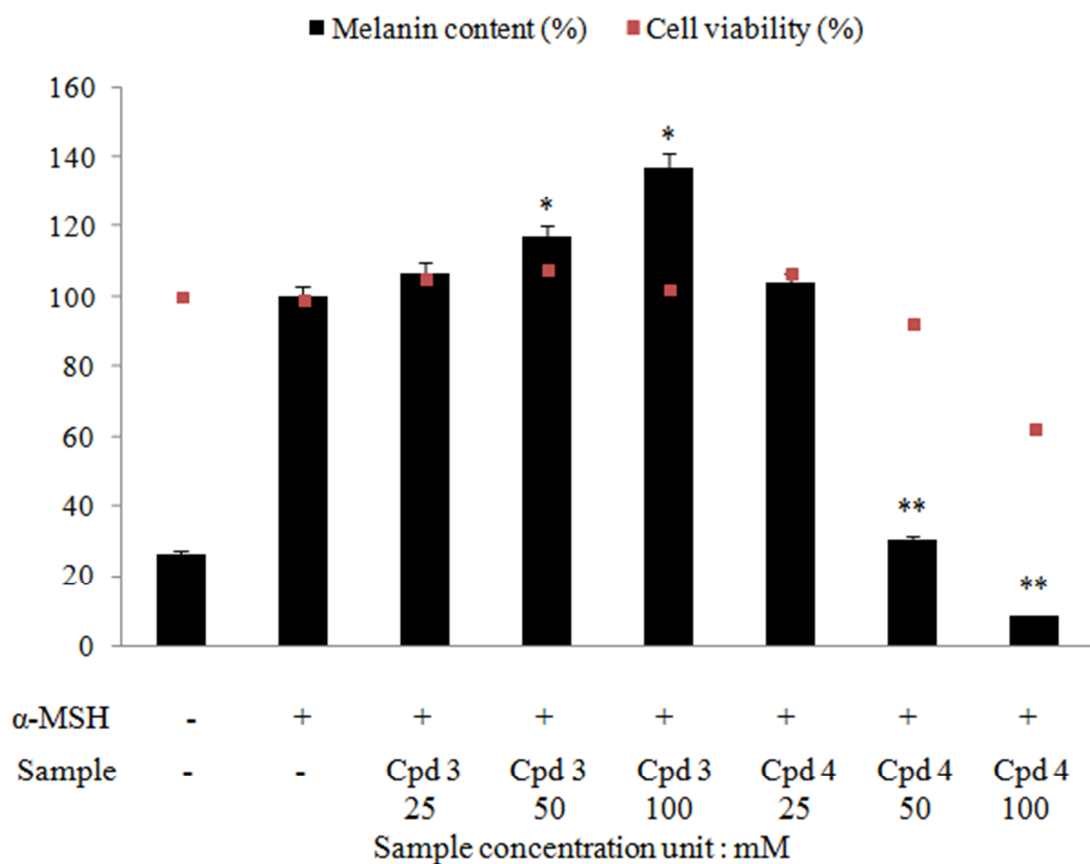


Figure 29. Melanin contents and cell viability of compound **3** and **4**. α-MSH(-); saline without α-MSH, α-MSH(+); α-melanocyte stimulating hormone without extract, Cpd **3**; compound **3** (6,7,8,3',4'-pentamethoxyflavone), Cpd **4**; compound **4** (tetramethyl-*O*-scutellarin). The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, versus α-MSH alone.

2. 제주 재래굴 미숙과(과피, 과육) 성분 분석 및 항산화 활성

1) 제주 재래굴 미숙과 과피 및 과육 추출물의 HPLC 분석 결과

재래굴 10종의 과피와 과육 추출물을 HPLC를 통해 13가지 플라보노이드 성분별 함량을 분석한 결과는 Table 12와 같다. 같은 농도의 시료를 같은 조건에서 분석한 결과 13가지 플라보노이드의 총량은 당유자(과피, 과육)가 가장 많았으며, 병굴(과피), 지각(과피, 과육), 편굴(과피) 및 사두감(과피)가 그램(g) 당 1000 μg 이상으로 높은 플라보노이드 함량을 나타내었다. 대부분의 품종에서는 알려진 바와 같이 과육보다 과피에 플라보노이드 함량이 다량 함유되어 있었으나, 당유자, 지각, 사두감의 경우 과피 뿐만 아니라 과육에도 플라보노이드 함량이 다량 함유되어 있음을 확인하였다. 본 연구에서 분석된 10종의 품종에서 auraptene은 검출되지 않았으며, 품종별 플라보노이드 분석의 자세한 결과는 다음에 나타내었다.

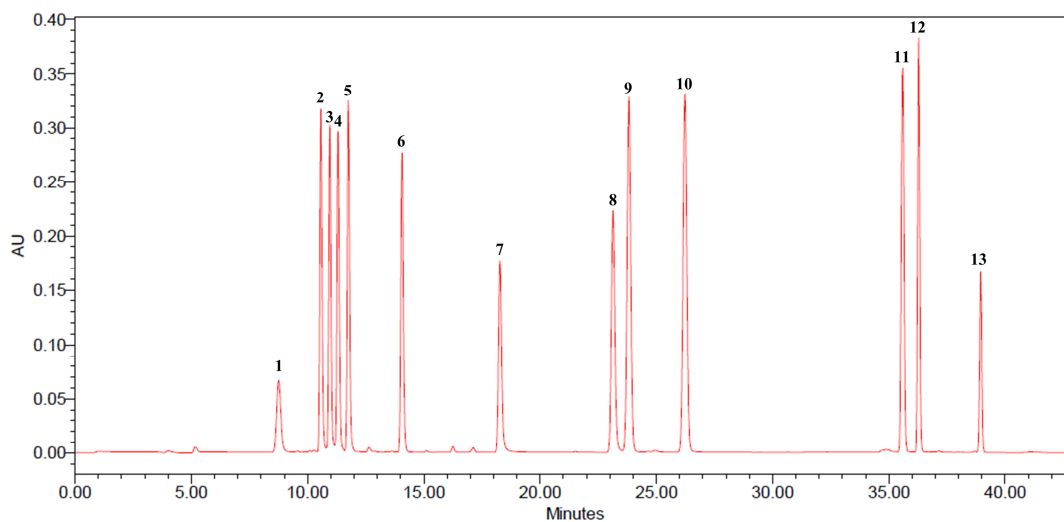


Figure 30. HPLC chromatogram of standard flavonoids. (1; rutin, 2; narirutin, 3; naringin, 4; hesperidin, 5; neohesperidin, 6; NHDC (neohesperidin dihydrochalcone), 7; quercetin, 8; apigenin, 9; naringenin, 10; hesperetin, 11; nobiletin, 12; tangeretin, 13; auraptene)

Table 12. Flavonoid contents ($\mu\text{g/g}$) of citrus extract identified by HPLC

No.		Total	Rutin	Narirutin	Naringin	Hesperidin	Neoh ¹⁾	NHDC ²⁾	Quercetin	Apigenin	Naringenin	Hesperetin	Nobiletin	Tangeretin	
1	Dangyuja	Peel	2117.3±63.9³⁾	50.0±6.2	54.8±3.8	895.9±47.9	91.5±1.2	982.3±23.3	4.3±0.2	3.5±0.6	N.D. ⁴⁾	N.D.	1.2±0.1	21.0±0.7	12.7±0.5
		Flesh	2293.4±131.8	34.8±2.5	85.3±10.5	1104.2±65.5	90.7±9.3	977.5±45.4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2	Byungkyool	Peel	1330.6±90.9	451.7±90.9	183.0±13.3	10.8±2.9	429.4±13.5	45.6±9.3	8.6±1.7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	135.2±29.8	66.4±17.0
		Flesh	470.9±47.5	108.6±12.8	238.3±17.9	4.0±0.2	103.9±17.0	6.5±0.6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	6.4±1.4	3.3±0.8
3	Jikak	Peel	1254.1±73.9	41.9±4.6	86.9±8.8	1065.3±54.8	3.9±0.5	14.6±2.1	13.8±5.2	7.67±0.4	1.2±0.1	0.2±0.1	1.4±0.2	10.9±1.4	6.2±1.0
		Flesh	1289.5±32.4	23.5±1.7	24.4±1.1	800.9±25.3	9.2±4.7	431.6±9.2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4	Yooja	Peel	589.1±14.4	21.7±0.9	164.7±5.5	123.8±3.2	242.8±7.1	6.4±0.5	23.8±0.2	5.2±0.1	N.D.	N.D.	N.D.	0.7±0.1	N.D.
		Flesh	364.7±31.9	8.2±1.6	142.9±14.7	86.5±8.4	84.5±6.9	40.0±2.6	2.5±0.2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
5	Jinkyool	Peel	422.5±52.4	100.7±3.3	16.6±0.9	1.4±0.1	132.4±31.8	4.0±0.1	2.5±1.4	9.1±3.0	3.3±0.1	N.D.	N.D.	86.1±8.6	66.4±10.3
		Flesh	94.4±6.6	11.1±0.9	2.9±0.5	2.2±0.1	58.5±4.3	4.7±0.3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	7.1±0.3	7.9±0.5
6	Binkyool	Peel	367.0±5.5	113.4±4.2	20.5±0.8	5.4±0.8	98.1±14.4	3.7±1.1	3.3±0.2	9.7±4.2	3.7±0.1	2.2±0.3	1.2±0.1	66.3±5.0	39.5±3.4
		Flesh	154.4±6.2	7.9±1.2	24.4±1.3	10.9±7.0	82.2±5.1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
7	Kamja	Peel	621.7±57.9	110.2±11.4	194.3±19.0	6.0±1.2	243.6±32.2	6.9±0.4	2.2±0.1	6.8±1.4	5.2±0.2	1.6±0.1	1.5±0.1	24.6±0.9	28.8±1.1
		Flesh	137.8±7.7	39.3±1.8	91.4±6.4	3.6±0.1	3.4±0.2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
8	Hongkyool	Peel	604.3±40.4	111.0±2.6	10.2±0.2	4.0±0.3	177.4±20.2	8.1±0.2	4.1±0.2	16.7±0.5	3.5±0.1	1.5±0.2	1.4±0.4	173.2±10.8	93.1±7.3
		Flesh	95.5±2.7	10.8±1.1	15.2±0.6	6.1±1.1	57.8±4.6	1.1±0.1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.5±0.1	2.0±0.1
9	Pyunkyool	Peel	1069.9±46.4	21.6±9.4	16.3±5.3	430.4±27.8	15.3±5.3	453.8±22.3	5.8±1.8	26.3±10.5	14.8±5.7	N.D.	N.D.	38.3±0.9	47.3±2.4
		Flesh	243.7±19.0	12.3±2.7	13.3±1.7	137.5±12.9	4.8±0.9	75.7±5.6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
10	Sadoogam	Peel	1012.8±75.4	49.3±5.1	785.7±18.1	4.4±1.6	165.1±57.4	1.8±0.3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	6.5±0.5	N.D.
		Flesh	890.9±34.9	54.7±2.2	732.9±28.6	4.1±0.3	99.2±8.6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

1) Neohesperidin

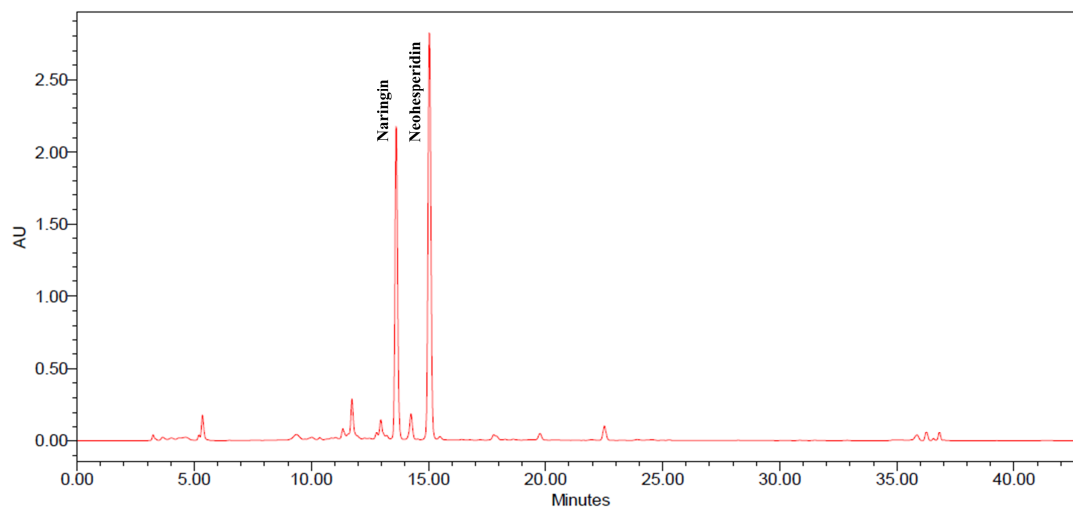
2) Neohesperidin dehydrochalcone

3) Results are mean±S.D. of triplicate data.

4) Not detected

먼저 당유자는 미숙과 및 완숙과에 대한 멜라닌 생성 억제 효과⁵² 등 다양한 생리 활성에 대한 연구가 진행되어 있으며, 염증 억제 효과⁵³ 또한 탁월하다고 보고되어 있다. 당유자 미숙과의 과피와 과육에는 naringin과 neohesperidin이 분석된 13가지 플라보노이드 총량의 대부분을 차지함을 확인할 수 있었다. 과피의 경우 분석된 플라보노이드의 총량(2117.3 µg/g) 중 naringin의 함량은 895.9 µg/g으로 약 42.3%, neohesperidin의 함량은 982.3 µg/g으로 약 46.4% 차지함을 알 수 있었다. 과육도 마찬가지로 분석된 총량(2293.4 µg/g) 중 naringin이 1104.2 µg/g으로 약 48.2%, neohesperidin은 977.5 µg/g으로 약 42.6% 함유되어 있으므로 보아 당유자 미숙과 과육과 과피에는 naringin과 neohesperidin이 주요 성분임을 확인 할 수 있었다(Figure 31).

(A)



(B)

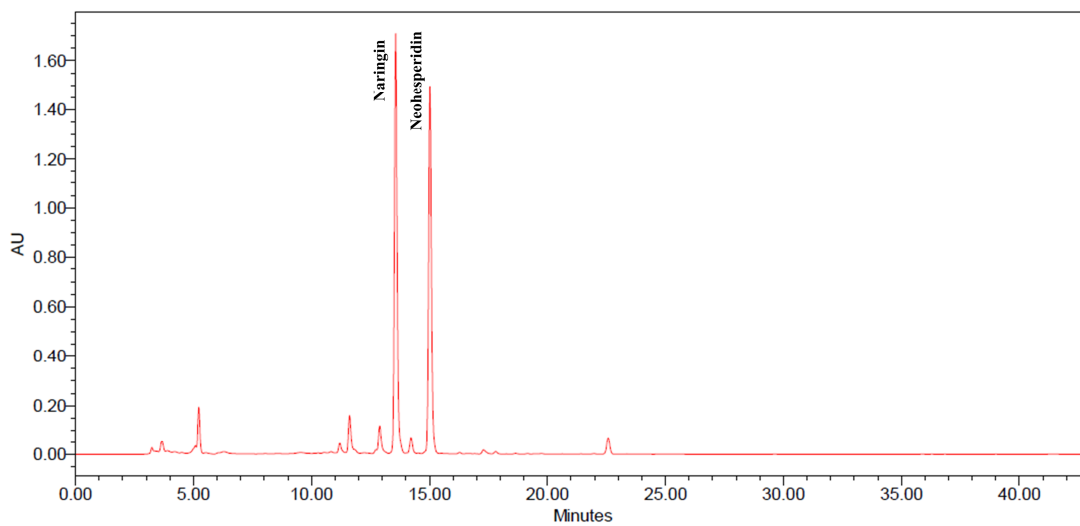


Figure 31. HPLC chromatogram of 'Dangyuja' (*C. grandis* Osbeck) immature fruit. (A) peel extract, (B) flesh extract.

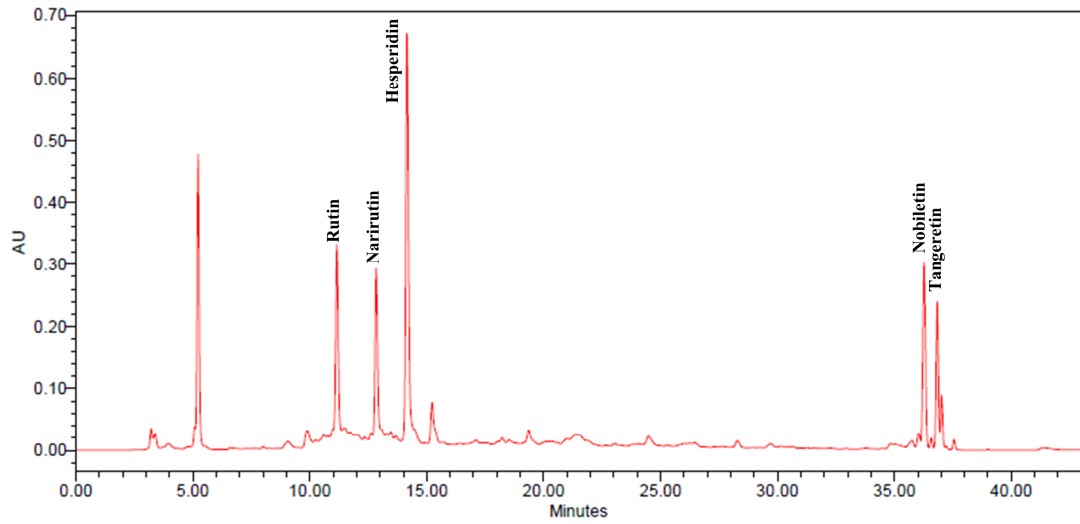
병굴 미숙과 과피에는 rutin과 hesperidin, 과육에는 narirutin이 대부분 차지함을 알 수 있었다. 과피의 경우 분석된 플라보노이드의 총량(1330.6 $\mu\text{g/g}$) 중 rutin의 함량이 451.7 $\mu\text{g/g}$ 으로 약 34.0%, hesperidin은 429.4 $\mu\text{g/g}$ 으로 약 32.3% 차지하고 있었다. 과육의 주요성분으로는 narirutin이 총량(470.9 $\mu\text{g/g}$)의 약 50.6%인 238.3 $\mu\text{g/g}$ 함유되어 있었고 과피에도 narirutin이 183.0 $\mu\text{g/g}$ 으로 총량의 13.7%를 차지하고 있었다(Figure 32).

지각 미숙과 과피와 과육에는 naringin이 대부분을 차지함을 알 수 있었다. 과피의 경우 분석된 플라보노이드 총량(1254.1 $\mu\text{g/g}$)의 약 85.0%인 1065.3 $\mu\text{g/g}$ 이 함유되어 있었고, 과육에는 총량(1289.5 $\mu\text{g/g}$)의 약 62.1%로 800.9 $\mu\text{g/g}$ 의 naringin과 더불어 neohesperidin이 약 33.5% (431.6 $\mu\text{g/g}$)가 함유되어 있음을 알 수 있었다(Figure 33).

유자 미숙과 과피에는 hesperidin이 41.2%(242.8 $\mu\text{g/g}$)로 가장 많은 비율을 차지하고 있었고 narirutin과 naringin이 각 28.0%(164.7 $\mu\text{g/g}$), 21.0%(123.8 $\mu\text{g/g}$)로 함유되어 있었다. 과육은 narirutin이 약 39.2%(142.9 $\mu\text{g/g}$)로 가장 많은 비율을 차지하고 있었고 naringin (23.7%, 86.5 $\mu\text{g/g}$), hesperidin (23.2%, 84.5 $\mu\text{g/g}$), neohesperidin (11.0%, 40.0 $\mu\text{g/g}$) 순으로 함유되어 있었다(Figure 34).

감자 미숙과의 경우도 유자와 마찬가지로 과피에 hesperidin이 약 39.2%(243.6 $\mu\text{g/g}$)로 가장 많이 함유되어 있었고 narirutin이 약 31.3%(194.3 $\mu\text{g/g}$) 함유되어 있었다. 과육에는 대부분 narirutin (66.4%, 91.4 $\mu\text{g/g}$)이 함유되어 있음을 알 수 있었다(Figure 35).

(A)



(B)

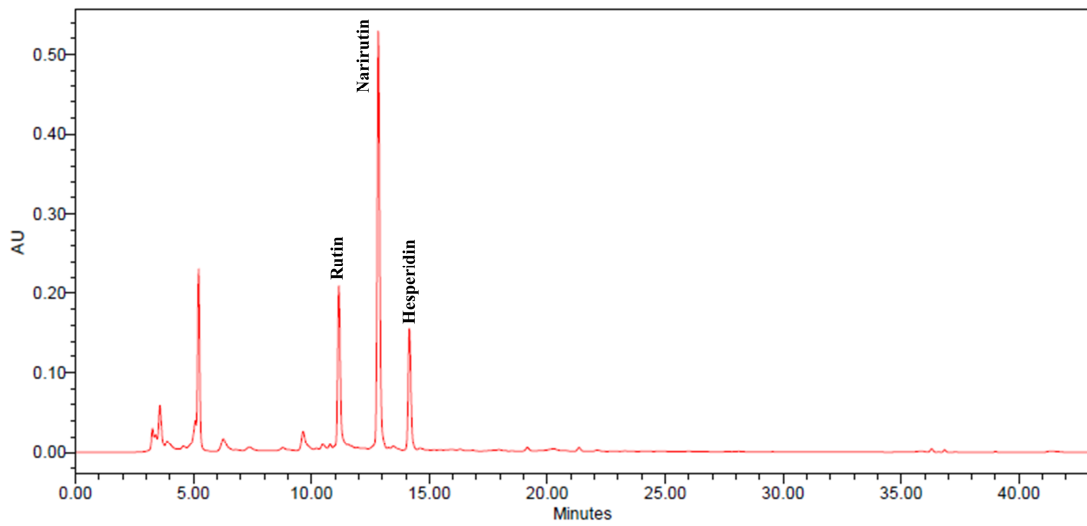
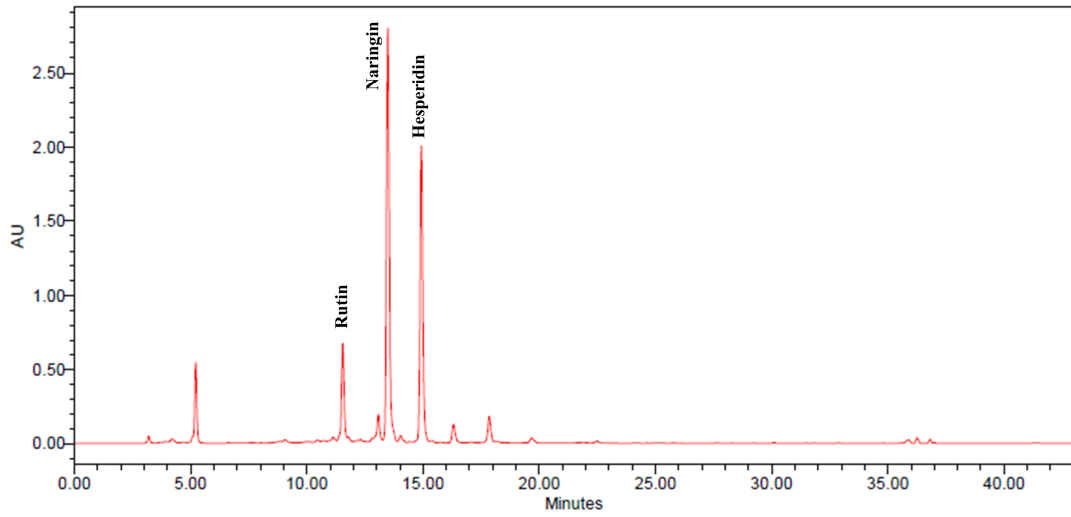


Figure 32. HPLC chromatogram of 'Byungkyool' (*C. platymamma* Hort. ex Tanaka) immature fruit. (A) peel extract, (B) flesh extract.

(A)



(B)

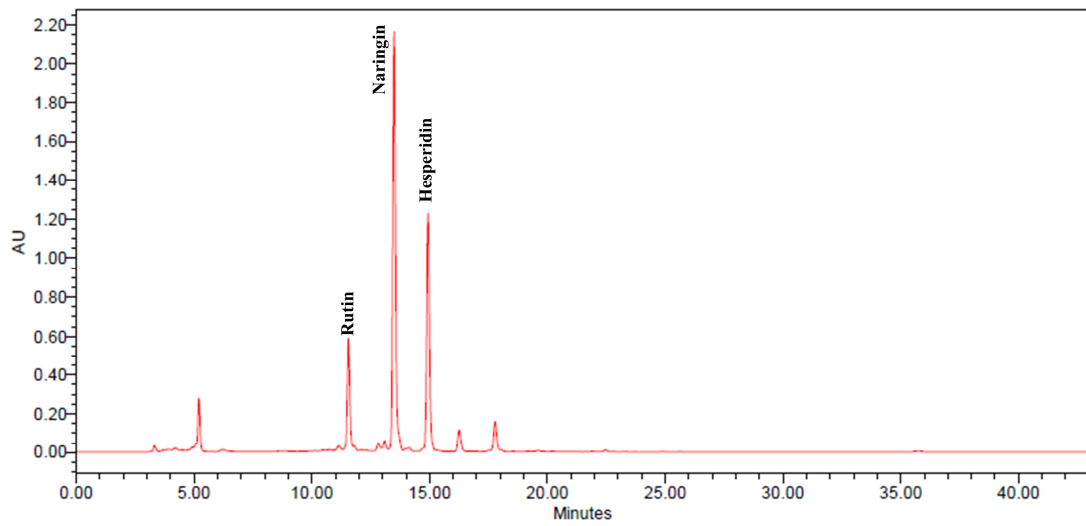
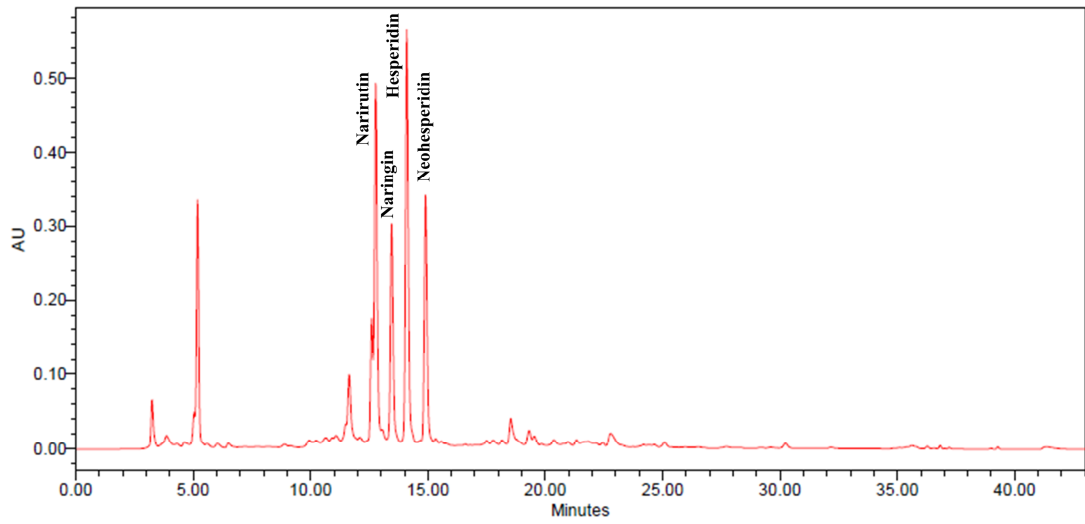


Figure 33. HPLC chromatogram of 'Jikak' (*C. aurantium* Linn) immature fruit. (A) peel extract, (B) flesh extract.

(A)



(B)

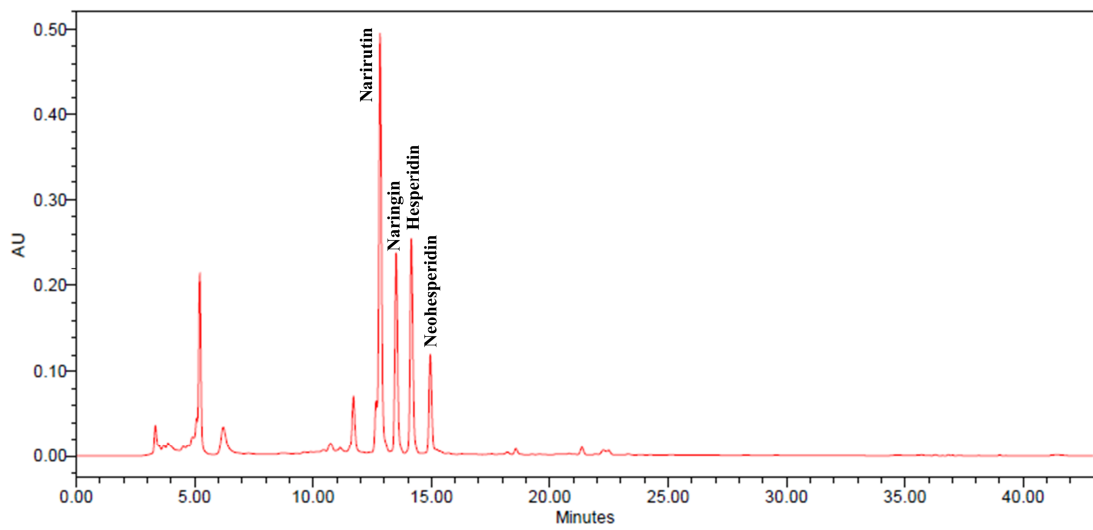
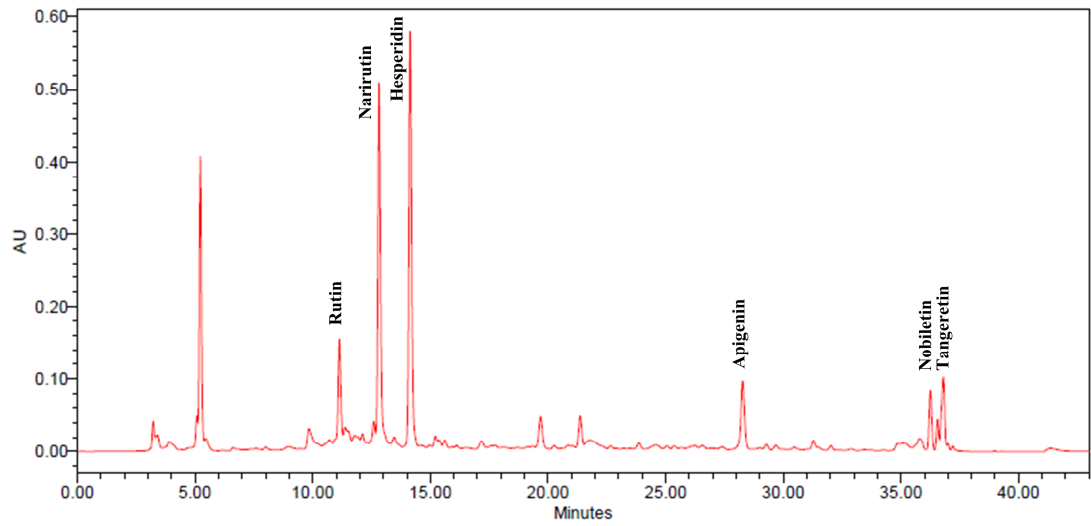


Figure 34. HPLC chromatogram of 'Yooja' (*C. junos* Sieb. ex Tanaka) immature fruit. (A) peel extract, (B) flesh extract.

(A)



(B)

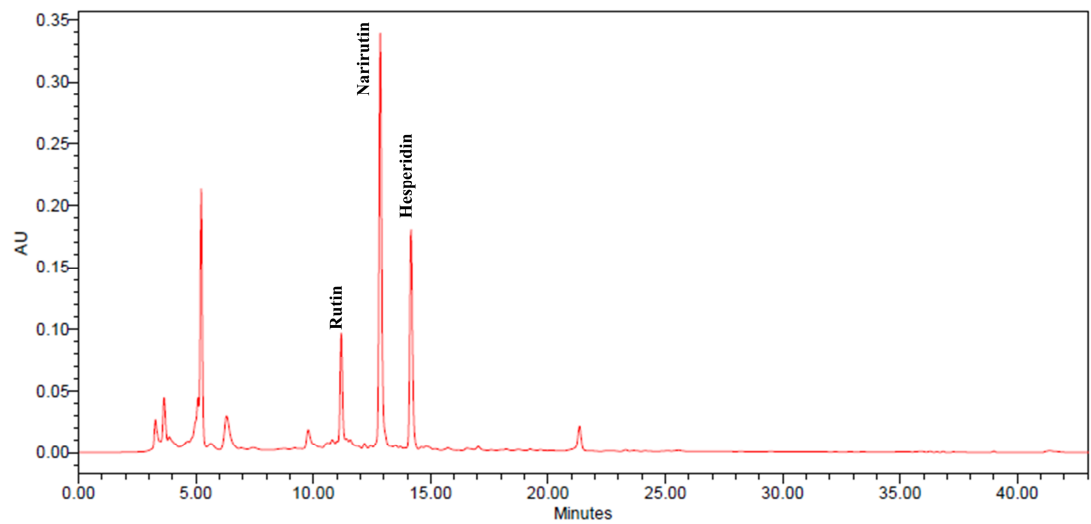


Figure 35. HPLC chromatogram of 'Kamja' (*C. benikoji* Hort. ex Tanaka) immature fruit. (A) peel extract, (B) flesh extract.

진귤, 빈귤 및 홍귤 미숙과의 과피에는 rutin과 hesperidin이 약 50%정도 차지하였으며 다른 품종과 달리 polymethoxyflavone (PMF)으로 분류되는 nobiletin과 tangeretin의 함량이 현저히 많이 함유되어 있음을 알 수 있었다. Nobiletin과 tangeretin 등의 PMF는 항산화, 항염 및 항 당뇨 등의 효능이 알려져 있으며 주로 감귤에서 유래한다고 알려져 있다.⁵⁴⁻⁵⁶

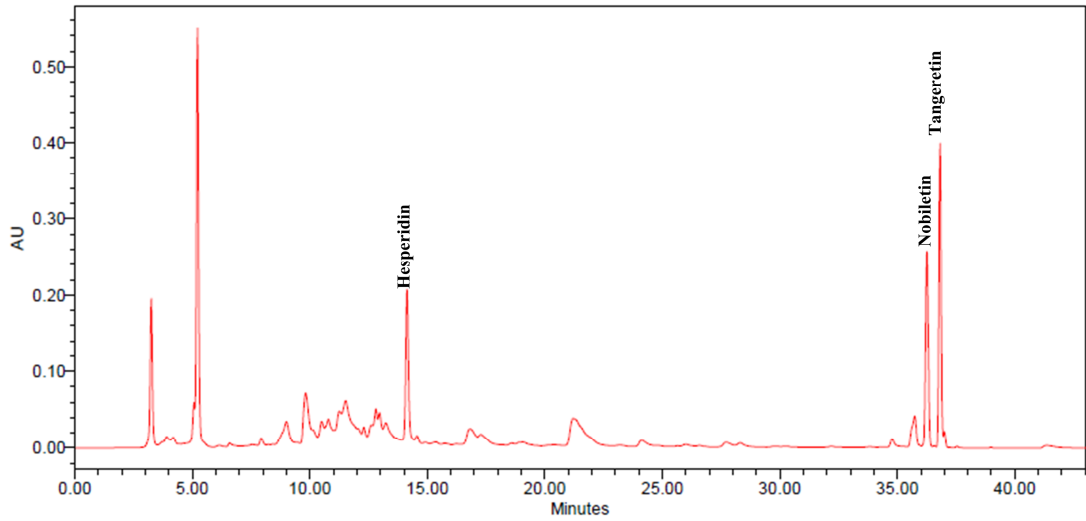
진귤 미숙과 과피에는 rutin (100.7 µg/g, 23.8%), hesperidin (132.4 µg/g, 31.3%), nobiletin (86.1 µg/g, 20.4%), tangeretin (66.4 µg/g, 15.7%)이 대부분 차지하고 있었다. 과육의 주요성분으로는 naringin (40.8%) 및 hesperidin (29.06%)으로 확인되었다(Figure 36).

빈귤 미숙과 과피에는 rutin (113.4 µg/g, 30.9%), hesperidin (98.1 µg/g, 26.7%), nobiletin (66.3 µg/g, 18.1%), tangeretin (39.5 µg/g, 10.8%)이 대부분 차지하고 있었다. 과육의 주요성분으로는 narirutin으로 총량(46.4 µg/g)의 약 52.5%인 24.4 µg/g 함유되어 있었다(Figure 37).

홍귤 미숙과 과피에는 rutin (111.0 µg/g, 18.4%), hesperidin (177.4 µg/g, 29.4%), nobiletin (173.2 µg/g, 28.7%), tangeretin (93.1 µg/g, 15.4%)이 대부분 차지하고 있었다. 과육의 주요성분으로는 hesperidin으로 총량(95.5 µg/g)의 약 60.5%인 57.8 µg/g이 함유되어 있었다(Figure 38).

PMF가 다량 함유 되어 있는 품종 중 홍귤의 기능성에 대한 연구는 superoxide anion radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radical 등 항산화 활성⁵⁷ 등이 보고되어 있으나, 홍귤 미숙과의 DPPH 및 ABTS radical 소거활성과, 항염 활성에 관한 연구가 진행되지 않아 추가적인 연구를 수행하였다.

(A)



(B)

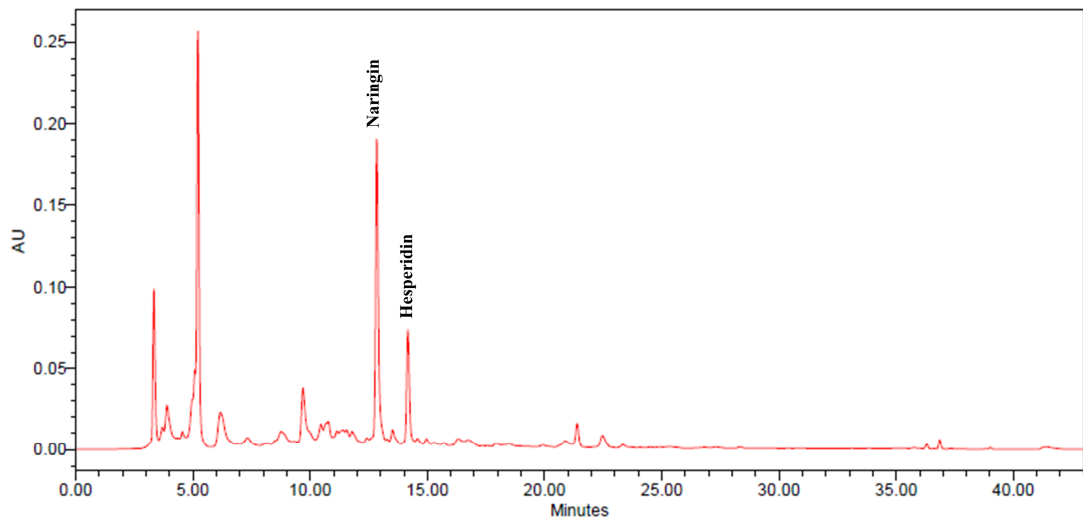
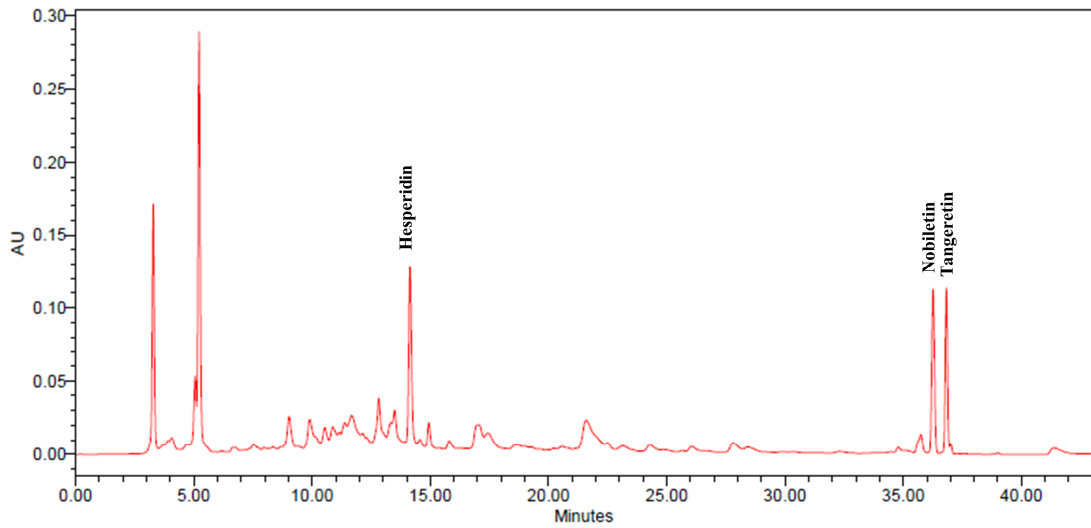


Figure 36. HPLC chromatogram of 'Jinkyool' (*C. sunki* Hort. ex Tanaka) immature fruit. (A) peel extract, (B) flesh extract.

(A)



(B)

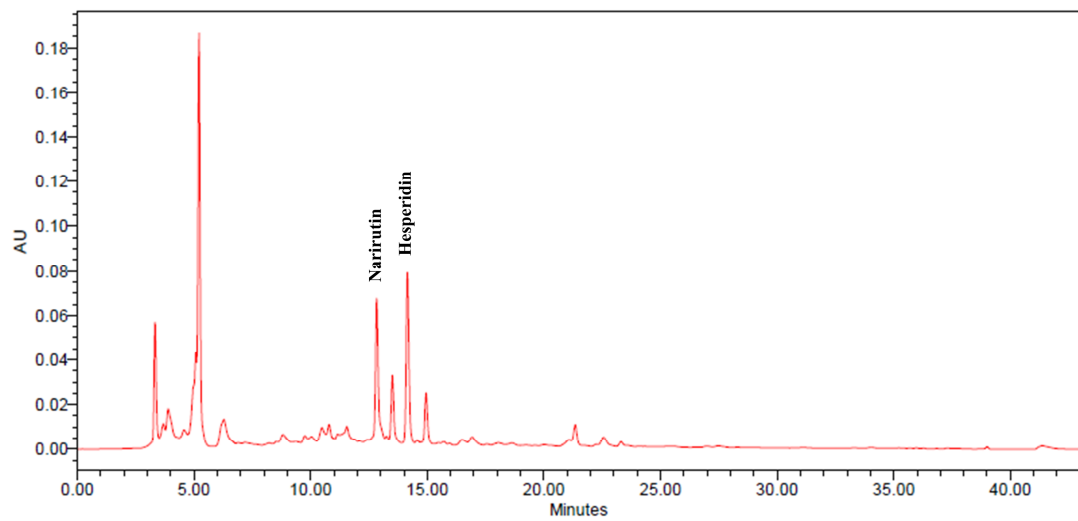
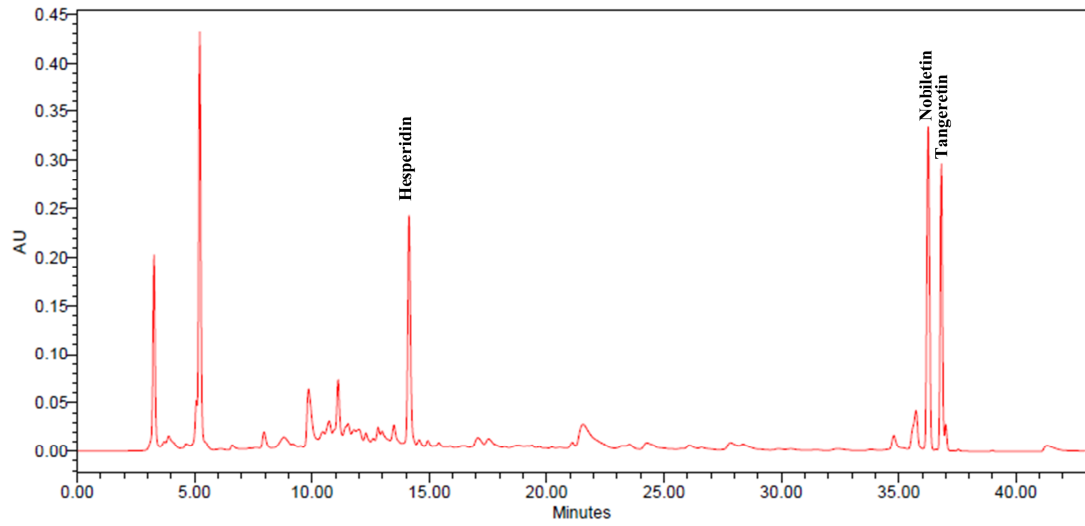


Figure 37. HPLC chromatogram of 'Binkyool' (*C. leiocarpe* Hort. ex Tanaka) immature fruit. (A) peel extract, (B) flesh extract.

(A)



(B)

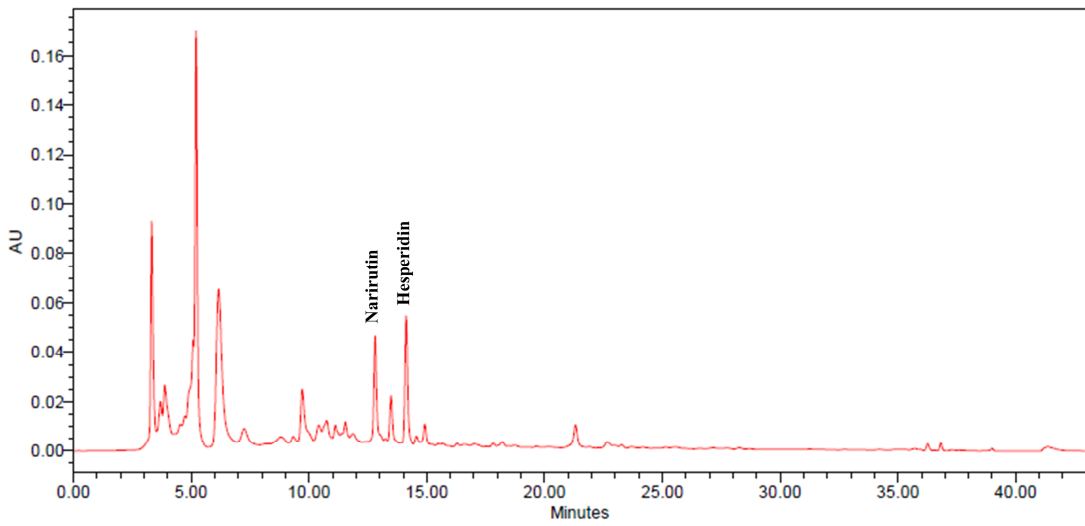
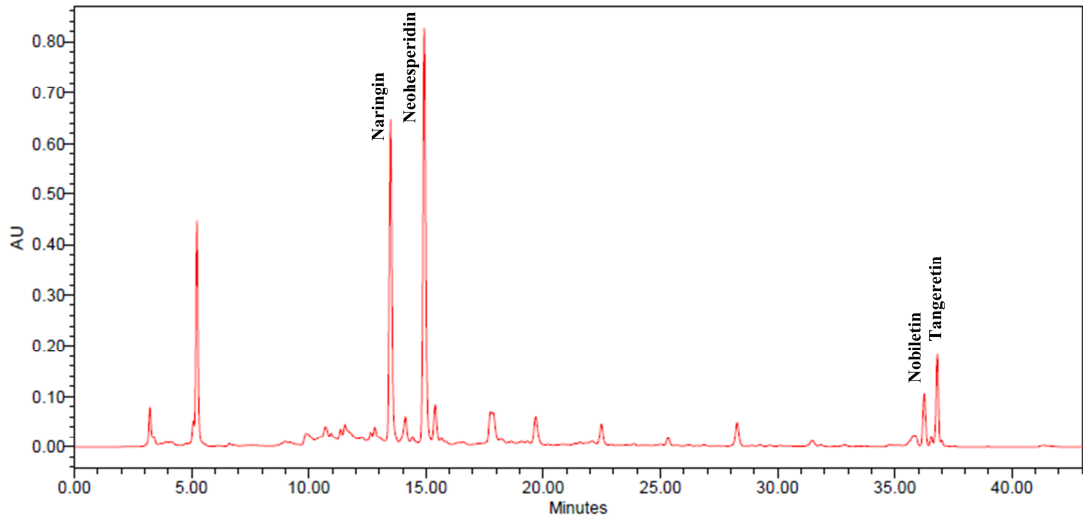


Figure 38. HPLC chromatogram of 'Hongkyool' (*C. tachibana* Hort. ex Tanaka) immature fruit. (A) peel extract, (B) flesh extract.

편갈 미숙과 과피에는 naringin (40.2%, 430.4 $\mu\text{g/g}$)과 neohesperidin (42.4%, 453.8 $\mu\text{g/g}$)이 대부분 차지함을 알 수 있었고 과육도 마찬가지로 naringin (47.9%, 97.6 $\mu\text{g/mL}$)과 neohesperidin (37.15%, 75.7 $\mu\text{g/mL}$)이 주로 함유되어 있음을 확인하였다(Figure 39).

사두감 미숙과 과피에는 narirutin (785.7 $\mu\text{g/g}$, 78.6%), neohesperidin (165.1 $\mu\text{g/g}$, 16.5%)이 대부분 차지하고 있었다. 과육도 마찬가지로 narirutin (732.9 $\mu\text{g/g}$, 82.3%), neohesperidin (99.2 $\mu\text{g/g}$, 11.1%)으로 구성되어 있음을 확인할 수 있었다(Figure 40).

(A)



(B)

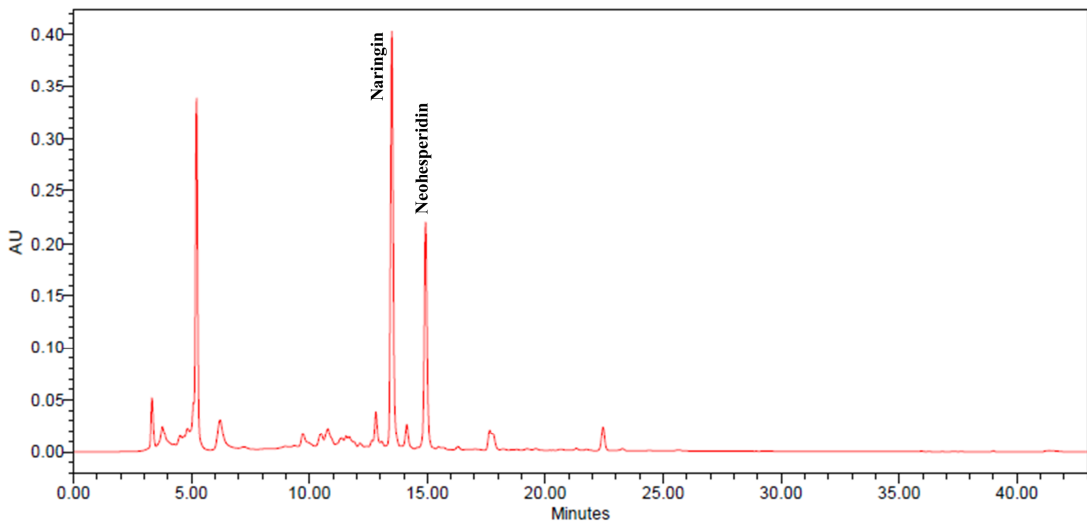
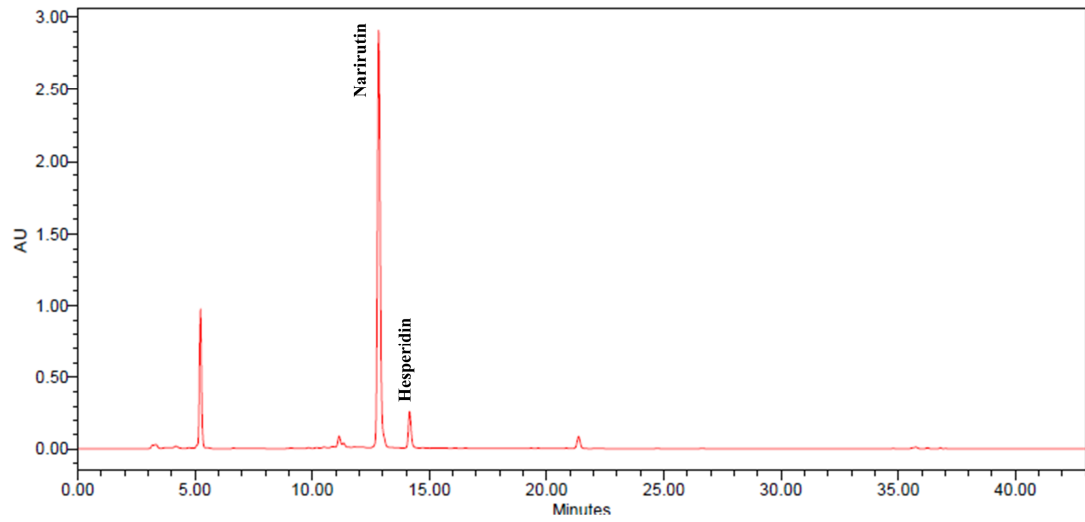


Figure 39. HPLC chromatogram of 'Pyunkyool' (*C. tangerina* Hort. ex Tanaka) immature fruit. (A) peel extract, (B) flesh extract.

(A)



(B)

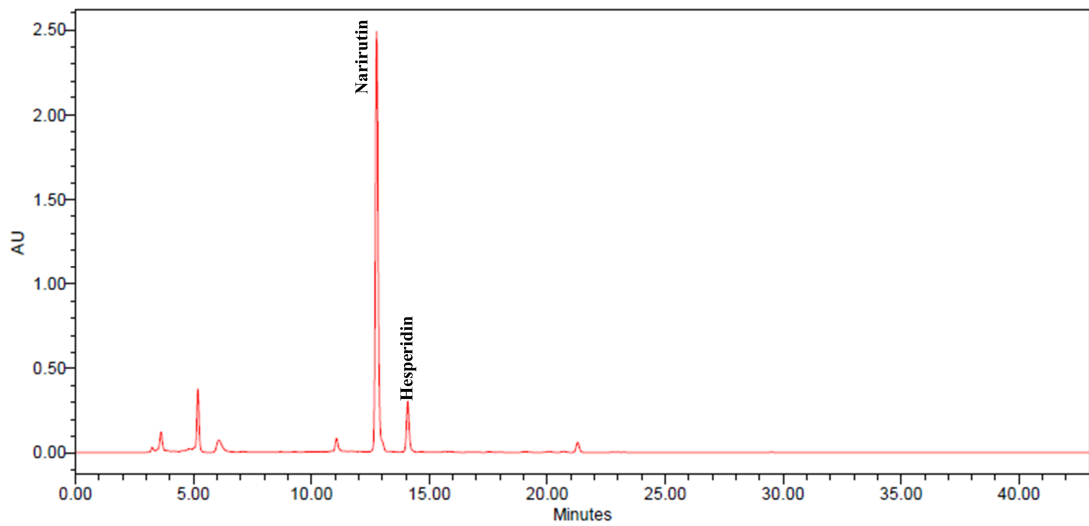


Figure 40. HPLC chromatogram of 'Sadookam' (*C. pseudogulul* Hort. ex Tanaka) immature fruit. (A) peel extract, (B) flesh extract.

2) 추출물의 항산화 활성

가. 추출물의 DPPH radical 소거 활성

항산화 활성을 측정하는 방법에는 여러 가지가 있으나 DPPH 라디칼 소거활성은 비교적 간단하면서 대량으로 측정이 가능한 항산화 측정법이다. DPPH는 라디칼 중 비교적 안정한 화합물로 황 함유 아미노산, ascorbic acid, 페놀성 화합물 등의 항산화 물질로부터 전자나 수소를 제공받아 DPPH-H로 환원되면서 자색이 탈색되는 원리를 이용하여 항산화 활성을 간단히 측정할 수 있는 동시에 식물체의 항산화 활성과도 연관성이 매우 높기 때문에 많이 이용되고 있는 방법이다.⁴⁸ 재래귤 10종의 미숙과 과피 추출물의 DPPH radical 소거활성은 대부분의 추출물에서 과육보다 과피 추출물이 radical 소거활성이 좋음을 확인할 수 있었다. 과피 추출물의 경우 빈귤 > 진귤 > 지각 > 홍귤 > 병귤 > 감자 > 편귤 > 유자 > 당유자 > 사두감 순으로 좋은 활성을 나타냈으며, 과육에서는 지각 > 진귤 > 빈귤 > 병귤 > 홍귤 > 당유자 > 감자 > 사두감 > 편귤 > 유자 순으로 좋은 활성을 나타내었다. HPLC 분석 결과와 더불어 플라보노이드 함량 및 PMF류의 함량과 항산화활성 결과가 밀접한 관련이 있는 것으로 사료된다(Table 13A, Figure 41A).

나. 추출물의 ABTS radical 소거 활성

ABTS는 비교적 안정한 free radical로써 항산화 활성을 스크리닝 하는데 많이 이용되고 있다. 또한 lipophilic 또는 hydrophilic 항산화 물질의 측정에 적용 가능한 방법으로 이 방법에 의한 항산화 활성은 ABTS radical을 억제하거나 소거하는 것에 의해 이루어진다. 재래귤 미숙과 과피 추출물의 ABTS radical 소거 활성은 농도의존적으로 radical을 소거하는 활성을 보였으며, 125 ug/mL 농도 이하로 추가 실험을 진행한 결과(데이터 미제시) radical을 50% 소거할 때의 농도인 IC₅₀는 홍귤이 40.4 ug/mL로 가장 좋은 활성을 나타내었다. 홍귤 다음으로 빈귤(48.4 ug/mL) > 지각(57.5 ug/mL) > 진귤(76.0 ug/mL) > 편귤(90.4 ug/mL) 순으로 ABTS radical 소거 활성이 높았다.

과육 추출물의 ABTS radical 소거 활성은 IC₅₀값이 당유자가 121.6 ug/mL로 가장 좋은 활성을 보였으며, 지각(182.1 ug/mL) > 병귤(398.9 ug/mL) > 진귤(462.3 ug/mL) > 사두감 (449.4 ug/mL) 순으로 좋은 항산화 활성을 나타내었다.

감귤 과육보다 과피에서 항산화 활성이 좋다고 알려진 바와 같이 모든 추출물에서 과육보다 과피의 radical 소거활성이 현저히 높게 나타났으며, HPLC 분석 결과와 더불어 플라보노이드 함량 및 PMF류의 함량과 밀접한 관련이 있는 것으로 사료된다(Table 13B, Figure 41B).

Table 13. Inhibitory concentration (IC)₅₀ value (µg/mL) of DPPH (A) and ABTS (B) radical of citrus immature fruit

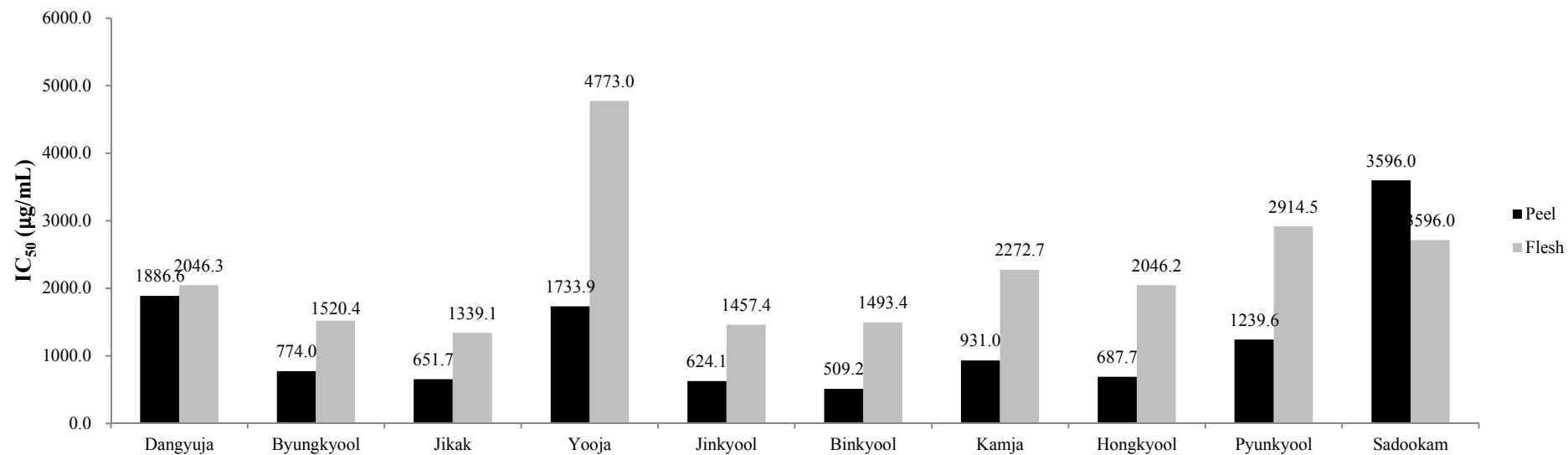
(A)

No.	Citrus	Peel	Flesh
1	Dangyuja	1886.6	2046.3
2	Byungkyool	774.0	1520.4
3	Jikak	651.7	1339.1
4	Yooja	1733.9	4773.0
5	Jinkyool	624.1	1457.4
6	Binkyool	509.2	1493.4
7	Kamja	931.0	2272.7
8	Hongkyool	687.7	2046.2
9	Pyunkyool	1239.6	2914.5
10	Sadookam	3596.0	2714.0

(B)

No.	Citrus	Peel	Flesh
1	Dangyuja	98.4	121.6
2	Byungkyool	111.0	398.9
3	Jikak	57.5	182.1
4	Yooja	174.2	720.4
5	Jinkyool	76.0	462.3
6	Binkyool	48.4	595.0
7	Kamja	132.9	729.2
8	Hongkyool	40.0	661.4
9	Pyunkyool	90.4	828.7
10	Sadookam	125.2	449.4

(A)



(B)

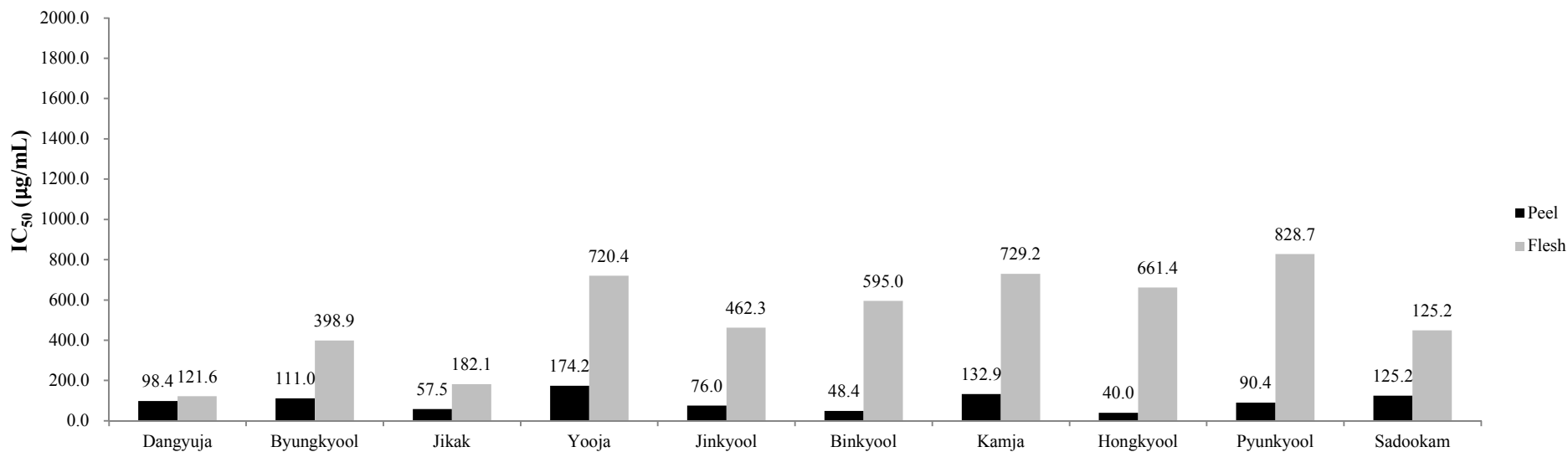


Figure 41. Inhibitory concentrate (IC_{50}) value ($\mu\text{g/mL}$) of DPPH (A) and ABTS (B) radical of citrus immature fruit.

3) '홍굴' 미숙과 과피 추출물의 생리활성 평가

분석된 10종의 재래굴 미숙과 결과를 토대로 최근 주목받고 있는 polymethoxyflavone (PMF)류가 다량 함유되어 있고, 아직 연구가 많이 되어 있지 않은 '홍굴'에 대해 추가적인 생리 활성 평가를 진행하였다.

'홍굴' (Hongkyool, *C. tachibana* Tanaka)은 제주 재래감귤로써 과피가 부드럽고 과실이 작은 특징을 갖고 있다. 과실 무게는 20 g 정도로 작고 과실모양은 편구형이다. 수확기는 2~3월이며 1월 상순 당도 13.2°Bx, 산 함량 1.91% 정도 된다. 내한성이 좋으나 부피과 발생이 심하며 제주도에 있는 재래종 중에서 유일하게 섬(섬섬)에서 자생한다. 재래감귤은 새로운 품종을 만들기 위한 교잡육종을 할 때 필요한 품종이며, 홍굴은 재래씨가 있고 농약을 사용할 필요가 없을 정도로 병충해에 아주 강한 특징이 있다. 이러한 재래감귤의 다양한 생리 활성을 검토하여 기능성 물질이 다량 함유되어 있는 신품종의 개발에 중요한 의미가 있다고 할 수 있다.

현재까지 홍굴의 기능성에 대한 연구는 superoxide anion radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radical 등 항산화 활성⁵⁷ 등이 보고되어 있으나, DPPH 및 ABTS radical 소거활성 및 항염 활성에 관한 연구가 미비하여 본 연구를 수행하게 되었다. 실험에 사용된 홍굴 미숙과는 제주도 서귀포시 감귤연구소 포장에서 재배된 과실을 2014년 9월 16일에 수확하여 사용하였다. 수확한 과실은 선별 및 세척 후 과피와 과육을 분리하고, 과피를 60°C 건조기에서 12~48시간 건조시킨 후 분쇄하여 사용하였다. 홍굴 미숙과 과피 70% MeOH 추출물 4.5 g을 극성 순서에 따라 순차적으로(*n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O) 분획하여 실험에 사용하였다(Figure 42).

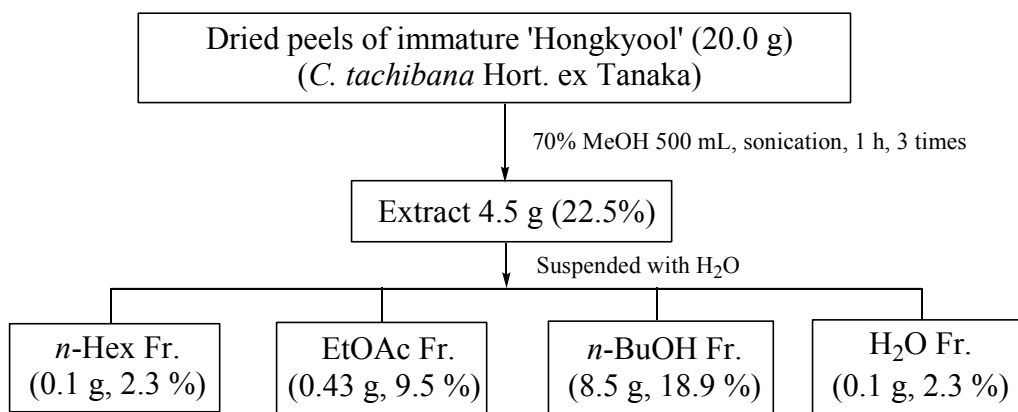


Figure 42. Procedure of extraction and fractionation from HIFP.

가. 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량 측정

Citrus류의 과피나 종자에는 페놀산과 flavonoids와 같은 페놀화합물들이 많이 함유되어 있으며, 종자나 과육보다 과피에 더 많이 함유되어 있음이 보고되었다.⁴⁵ 페놀계 물질들은 식물체에 특수한 색깔을 부여하고, 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl(OH)기를 가진 방향족 화합물들을 가리키며, 플라보노이드와 탄닌이 주성분으로 충치예방, 고혈압 억제, 항에이즈, 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다.⁴⁵ 각 분획물에 함유된 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 Table 14와 같다. 홍귤 *n*-BuOH 분획물에서 총 페놀성 화합물의 함량이 534.4 mg/g으로 가장 높았으며, 그 다음으로 EtOAc, *n*-Hex, 그리고 Water 분획물 순이었다. 총 플라보노이드 함량에 있어서도 *n*-BuOH 분획물에서 431.8 mg/g으로 가장 높게 나타났으며 EtOAc, *n*-Hex, Water 분획물 순으로 조사되었다.

Table 14. Total phenolic and total flavonoid contents of solvent fractions from HIFP

Fractions	Total phenolic content (mg/g, GAE)	Total flavonoids content (mg/g, QE) ¹⁾
<i>n</i> -Hex	186.7±7.1	51.4±1.5 ²⁾
EtOAc	470.6±10.4	217.5±7.4
<i>n</i> -BuOH	534.4±4.8	431.8±9.5
Water	123.6±1.45	48.8±2.8

1) GAE; gallic acid equivalent, QE; quercetin equivalent

2) Results are mean ± SD (n=3).

나. DPPH 라디칼 소거능 측정

항산화 활성을 측정하는 방법에는 여러 가지가 있으나 DPPH 라디칼 소거활성은 비교적 간단하면서 대량으로 측정이 가능한 항산화 측정법이다. DPPH는 라디칼 중 비교적 안정한 화합물로 황 함유 아미노산, ascorbic acid, 페놀성 화합물 등의 항산화 물질로부터 전자나 수소를 제공받아 DPPH-H로 환원되면서 자색이 탈색되는 원리를 이용하여 항산화 활성을 간단히 측정할 수 있는 동시에 식물체의 항산화 활성과도 연관성이 매우 높기 때문에 많이 이용되고 있는 방법이다.⁴⁸ 홍굴 과피 추출물의 용매 분획에 따른 DPPH 라디칼 소거 활성은 Figure 43와 같다. 농도 별 시료 처리에 의해 DPPH 라디칼 소거능이 *n*-Hex 분획물은 1.65, 3.01, 4.99, 5.93, 16.14%, EtOAc 분획물은 16.49, 23.31, 42.44, 61.73, 84.70%, *n*-BuOH 분획물은 26.38, 40.61, 71.65, 88.15, 89.19%, water 분획물은 5.24, 5.63, 17.05, 24.90, 53.26%을 보여 *n*-BuOH 분획물이 가장 좋은 활성을 보였다. 반면 *n*-Hex 분획물과 water 분획물은 50% 이하의 낮은 활성을 보였다. 시료의 IC₅₀ 값은 *n*-Hex 및 water 분획물은 1000 µg/mL 이상이였으며, EtOAc 분획물은 397.27 µg/mL, *n*-BuOH 분획물은 136.61 µg/mL으로 나타났다. Cho 등⁵⁸은 식물추출물의 DPPH 라디칼에 대한 소거활성은 phenolic content와 밀접한 관계가 있으며 특히 플라보노이드 보다는 폴리페놀 성분에 의해서 항산화 활성이 나타난다고 보고했는데, 본 실험의 결과에서도 폴리페놀 함량이 높은 *n*-BuOH 분획물, EtOAc 분획물 순으로 DPPH 라디칼 소거능이 높게 나타난 것과 관련이 있을 것으로 판단된다.

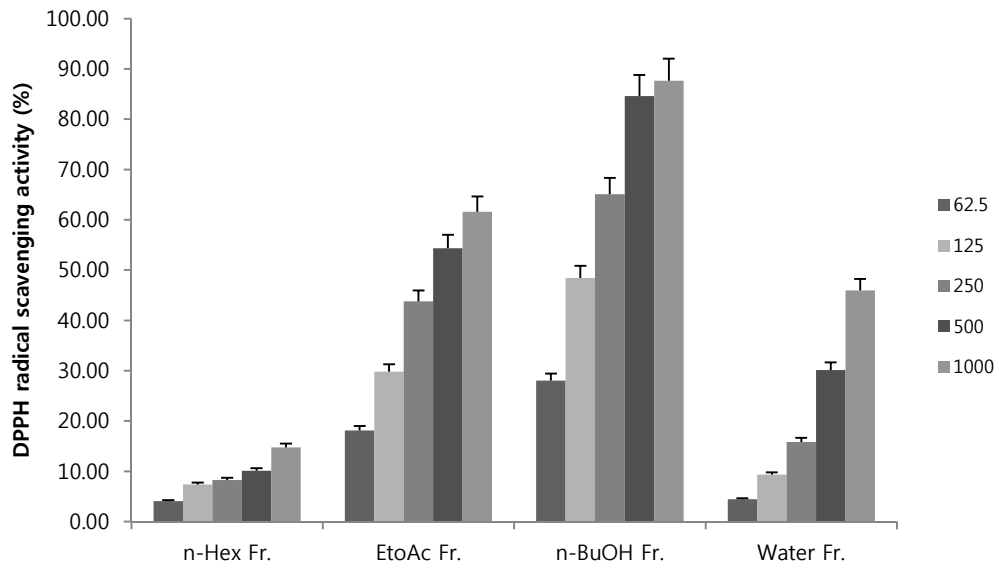


Figure 43. DPPH radical scavenging activities of solvent fraction from HIFP. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

다. ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS는 비교적 안정한 free radical로써 DPPH 방법과 함께 항산화 활성을 스크리닝 하는데 많이 이용되고 있다. 또한 lipophilic 또는 hydrophilic 항산화 물질의 측정에 적용 가능한 방법으로 이 방법에 의한 항산화 활성은 ABTS radical을 억제하거나 소거하는 것에 의해 이루어진다.⁵⁹ 홍굴 미숙과 과피 추출물의 용매 분획물에 따른 ABTS radical 소거능 측정 결과는 Figure 44 와 같다. *n*-BuOH 분획물에서 ABTS radical 소거능이 가장 우수하였으며, 다음으로 EtOAc 분획물의 활성이 좋았다. EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물 저농도에 대하여 추가 실험을 진행한 후 IC₅₀ 값을 계산하였다. 그 결과 *n*-BuOH 분획물(21.72 µg/mL), EtOAc 분획물(28.89 µg/mL), Water 분획물(118.78 µg/mL) 및 *n*-Hex 분획물 (278.94 µg/mL) 순으로 좋은 활성을 나타내었다. EtOAc 분획물에서는 가용인 flavonoid, alkaloid 등의 적당한 극성의 물질을 얻을 수 있으며 *n*-BuOH의 경우, 더욱 극성이 큰 물질인 배당체(당 함유 물질)등이 추출되어 나온다.⁴⁷ 홍굴 과피 분획물의 항산화 활성 결과 *n*-BuOH 및 EtOAc 분획물에서 좋은 활성을 보였으나 추후 EtOAc 분획물에서 유효한 flavonoid나 alkaloid 등을 분리하기 위하여 EtOAc 분획물에 대한 항염활성 실험을 진행하였다.

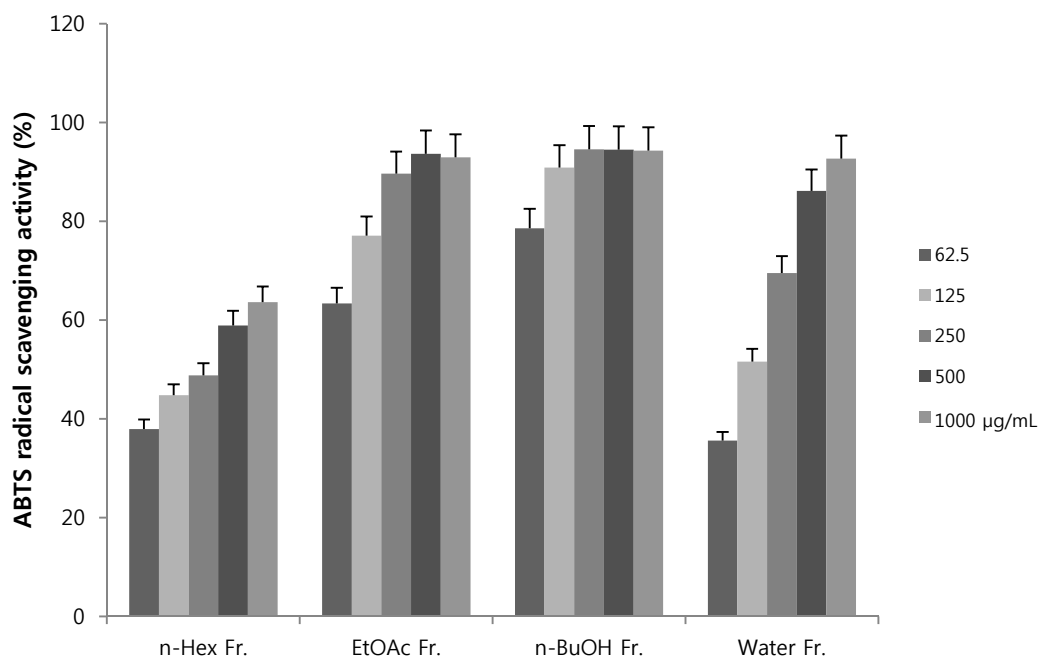


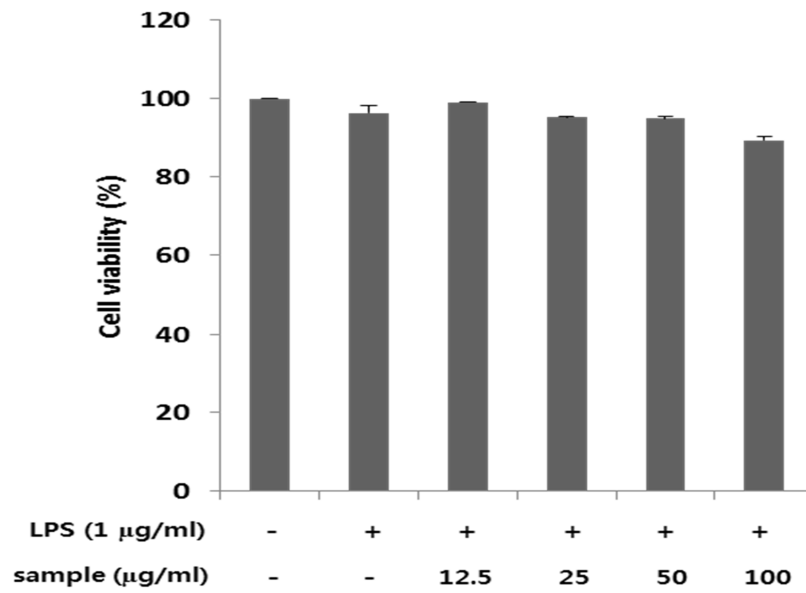
Figure 44. ABTS radical scavenging activities of solvent fraction from HIFP. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

라. 홍굴 EtOAc 분획물의 항염 효능 측정

홍굴 EtOAc 분획물의 세포 독성을 측정하기 위해 RAW 264.7 macrophage의 세포 생존율을 MTT assay로 분석하였다. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)분석은 탈수소효소 작용에 의해 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색의 formazan으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법으로 이 검사법은 세포의 증식과 성장을 알아보는 대표적인 실험 방법 중 하나로 살아있는 세포 수에 비례해서 흡광도를 나타낸다.³⁸ 홍굴 EtOAc 분획물의 세포 독성을 측정한 결과, 모든 농도에서 90% 이상의 생존율을 보여 세포 독성은 나타나지 않는 것으로 확인하였다(Figure 45A).

Nitric oxide (NO)는 free radical인 활성질소종(Reactive Nitrogen Species: RNS)의 일종으로 NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine이 citrulline으로 산화될 때 발생하는 반응성이 매우 높은 것으로 알려져 있다, 정상적인 농도로 존재하는 NO는 면역계의 전달 물질로써 신경전달물질을 운반하거나 종양을 억제하는 작용 등 매우 다양한 기능을 가지는 물질로 알려져 있다. 그러나 과도하게 발현된 NO는 독성 radical로 작용하여 인체에 유해한 영향을 주는 세포 손상뿐만 아니라 염증 반응을 비롯한 퇴행성 질환에 중요한 요인으로 작용하는 것으로 보고되어 있다.⁵¹ Lipopolysaccharide (LPS)를 대식세포에 처리하여 nitric oxide (NO)를 유도 시킨 후 시료를 처리하여 NO 생성에 미치는 영향을 조사한 결과 25 µg/ml에서 NO 소거능이 59.6%, 50 µg/ml에서 67.3%로 현저히 감소하였으며 추출물의 농도가 증가할수록 NO 생성량이 감소하였다(Figure 45B).

(A)



(B)

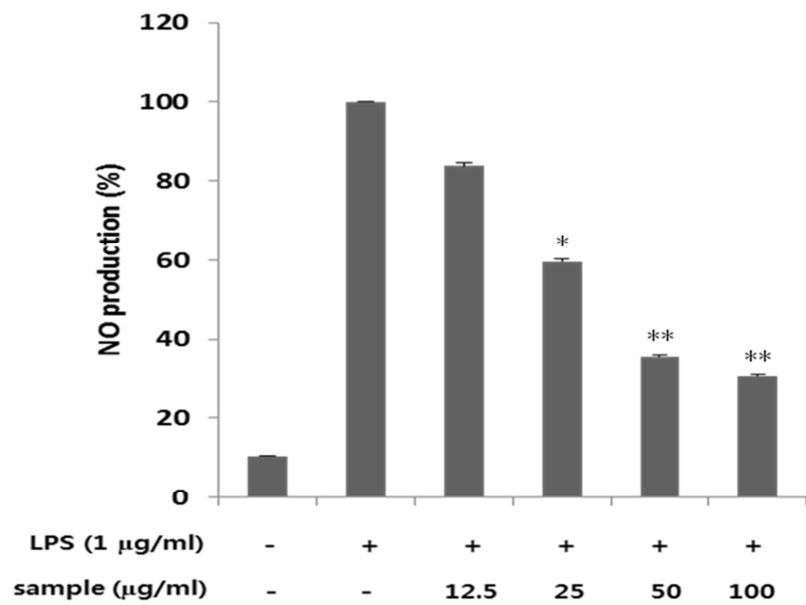


Figure 45. Cell viability (A) and nitric oxide production (B) of EtOAc fraction from HIFP on RAW264.7 macrophage. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

마. Pro-inflammatory cytokine 억제 활성

염증성 cytokine으로 대표되는 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 는 염증 반응을 매개하는 물질로 특히 초기 염증 반응에 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. 그 중 IL-6는 B cell이 plasma cell로 분화되는 마지막 단계를 활성화시키고 염증 병변에서 증가하는 것으로 알려져 있다.³⁹ 홍굴 EtOAc 분획물의 IL-6 생성 억제 효과를 측정된 결과, 처리 농도 의존적으로 IL-6의 생성을 효과적으로 감소시키는 것을 알 수 있었으며, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 약 41%(6.8 ng/ml)로 좋은 IL-6 생성 억제 효과를 나타냈다(Figure 46).

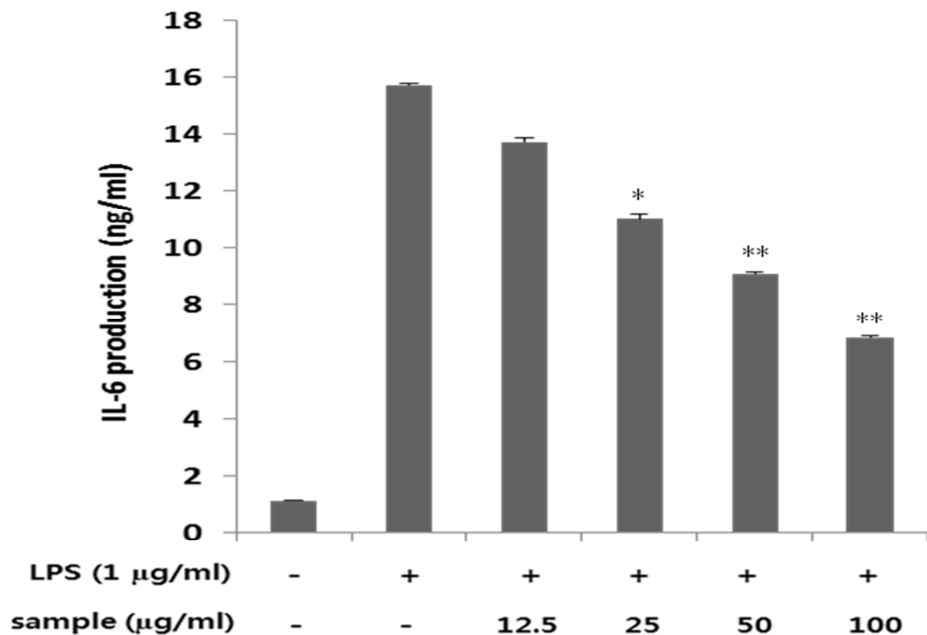


Figure 46. The effect of EtOAc fraction from HIFP on pro-inflammatory cytokine IL-6 level of LPS-induced RAW264.7 macrophage. Results are mean \pm SD of triplicate data.

마. iNOS, COX-2 단백질 발현량 측정

체내 염증 과정에서는 과량의 NO 및 prostaglandin E₂ (PGE₂) 등의 염증 인자가 유도형 NO synthase (iNOS) 및 cyclooxygenase (COX-2)에 의해 생성된다고 알려져 있다.⁶⁰ 따라서 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell에서 iNOS, COX-2 protein 발현량의 감소에 의해 항염증 효과를 기대할 수 있기 때문에 홍굴 에틸아세테이트 분획물이 iNOS, COX-2 protein 발현 저해효과가 있는지를 알아보기 위해 western blotting으로 두 단백질의 발현 변화를 확인하였다(Figure 48). LPS 비처리군은 두 단백질 모두 거의 발현되지 않은 반면 LPS 처리 군에서는 발현이 현저히 증가됨을 확인하였고, 홍굴 EtOAc 분획물을 농도별로 처리한 결과, iNOS, COX-2 단백질 발현이 효과적으로 억제되는 것을 확인 할 수 있었다(Figure 47).

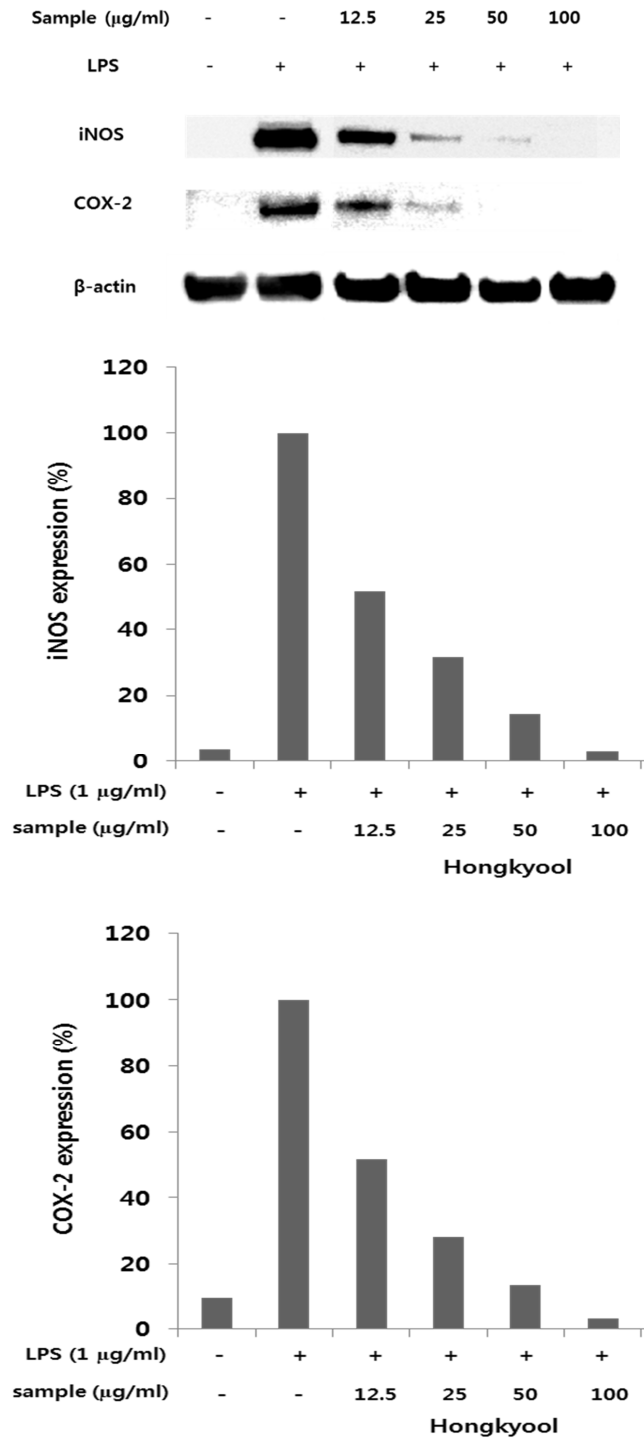


Figure 47. The effect of EtOAc fraction from HIFP of iNOS and COX-2 protein expression in RAW264.7 macrophage. Results are mean \pm SD of triplicate data.

3. 감귤 정유의 성분 분석 및 활성 평가

1) 온주, 하귤, 하밀감 및 신예감 정유의 GC/MSD 성분분석

감귤 정유는 감귤 과피 flavedo 층의 유포(oil glands) 중에 함유되어 있는 방향 성분으로 감귤의 종류는 물론 동일 종에서도, 기후, 품종, 과실의 온숙 및 저장의 시간적 변화 등에 의해서 성분의 변화가 있으며, 세정제, 식품 향료 의약품 등에 첨가제로 널리 이용되고 있다.

온주, 하귤, 하밀감 및 신예감 과피에서 추출된 정유의 수율은 약 1.3%였으며 얻어진 정유는 GC/MSD를 이용하여 13종류의 화학적 조성을 분석하였다. 분석된 성분에는 향산화, 향균 및 향염 활성이 우수한 것으로 알려진 limonene이 각각 86.64, 85.90, 86.01, 89.83%로 주요 성분임을 확인할 수 있었다. 온주, 하귤 및 하밀감 과피 정유의 경우 limonene 다음으로 γ -terpene (7.02, 8.62, 7.92%), β -myrcene (2.17, 2.42, 2.30%)이 높게 함유되어 있음을 확인할 수 있었다. 하지만 신예감 과피는 limonene 다음으로 β -myrcene (2.68%), linalool (1.88%), octanal (1.88%), *n*-octanol (1.45%)이 함유되어 있음을 확인하였다(Table 15). 이러한 결과를 통해 품종별 화학적 조성의 차이에 따른 생리 활성의 차이가 나타날 것으로 예상하고 향산화 및 향균 활성 실험을 진행하였다.⁶¹⁻⁶³

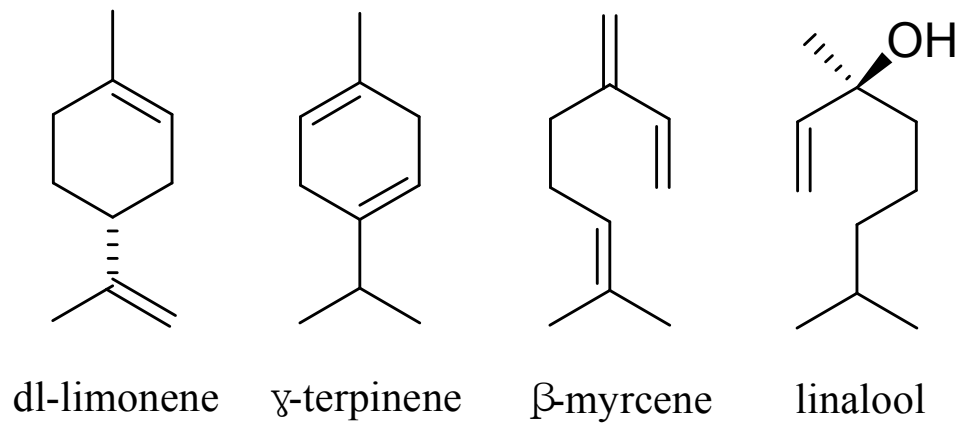


Figure 48. Major constituents of the essential oil in citrus fruit peel.

Table 15. Chemical compositions of ‘Unshu’, ‘Natsudaidai’, ‘Hamilgam’, and ‘Shinyegam’ essential oil

RT (min)	Constituents	Peak area (%)			
		Unshu	Natsudaidai	Hamilgam	Shinyegam
Monoterpene hydrocarbons					
7.97	β -pinene	-	0.69	0.58	-
8.72	Sabinene	0.31	0.16	0.19	0.36
11.36	β -myrcene	2.17	2.42	2.30	2.68
13.57	dl-limonene	86.64	85.90	86.01	89.83
13.63	β -phellandrene	-	0.39	0.42	0.44
15.64	γ -terpinene	7.02	8.62	7.92	0.06
16.20	β -ocimene	0.11	0.26	-	0.08
16.92	p -cymene	1.13	0.49	-	-
17.54	α -terpinolene	0.44	0.49	0.45	-
		97.83	99.43	97.87	93.46
Alcohols					
18.35	Octanal	-	0.07	0.09	1.67
27.62	β -linalool	-	0.12	-	-
34.68	Linalool	1.43	-	0.81	1.88
35.16	n-Octanol	-	-	-	1.45
		1.43	0.18	0.90	5.01

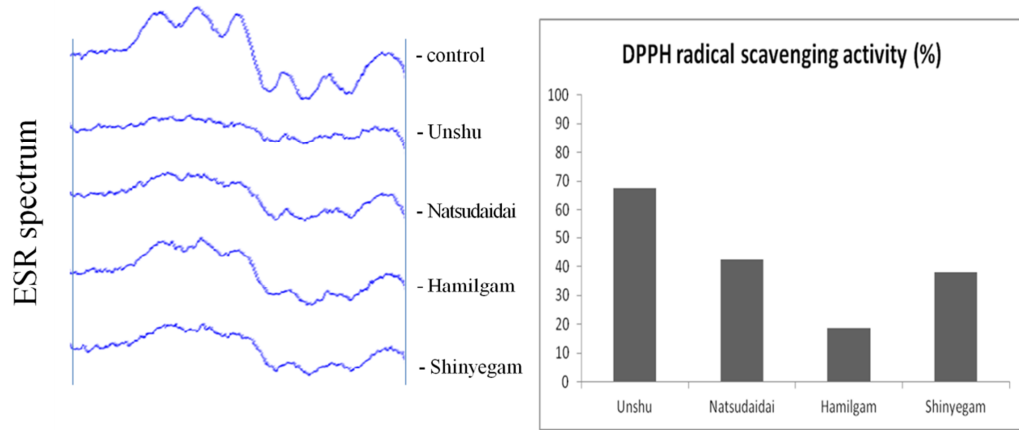
* RT, Retention time

Components were identified by comparison of their mass spectra in the GC/MS library

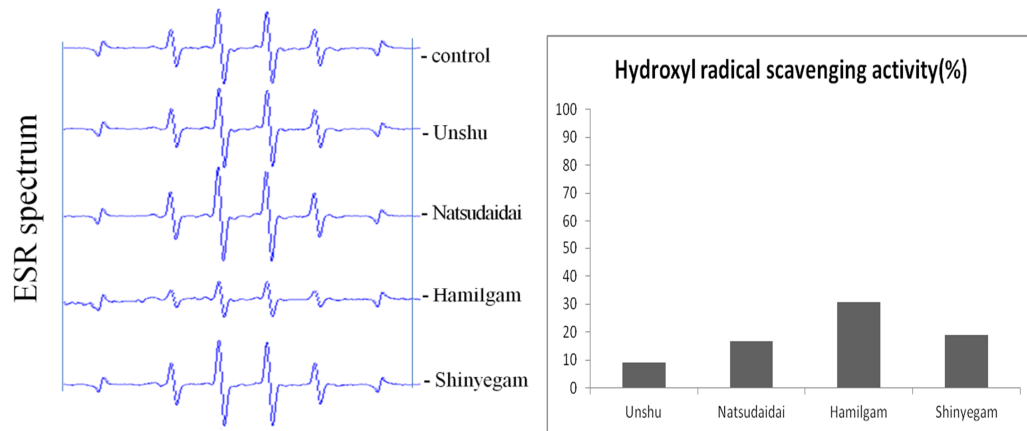
2) ESR을 이용한 항산화 활성

온주, 하귤, 하밀감 및 신예감 정유의 항산화 활성을 ESR 방법을 이용하여 DPPH, hydroxyl, alkyl radical에 대한 소거능을 측정하였다. 그 결과, 온주 정유가 DPPH radical에 대해 높은 항산화 활성을 가지는 것으로 확인되었고, 같은 농도에서 온주 다음으로는 하귤 > 신예감 > 하밀감 순으로 DPPH radical을 소거하는 것을 확인하였다. Hydroxyl radical은 하밀감 정유에서 높은 활성을 가지고 있었고, 같은 농도에서 하밀감 정유 다음으로 신예감 > 하귤 > 온주 순으로 나타났다. 또한 alkyl radical 소거능은 온주 > 하밀감 > 신예감 > 하귤 순으로 높게 나타남을 확인하였다. 이러한 정유의 항산화 활성은 각 radical과 정유에 포함되어 있는 성분에 따라 활성의 차이가 있는 것으로 보여지는데 monoterpene hydrocarbon류와 monoterpene alcohol류 함량 차이에 따른 것으로 사료된다(Figure 49).

(A)



(B)



(C)

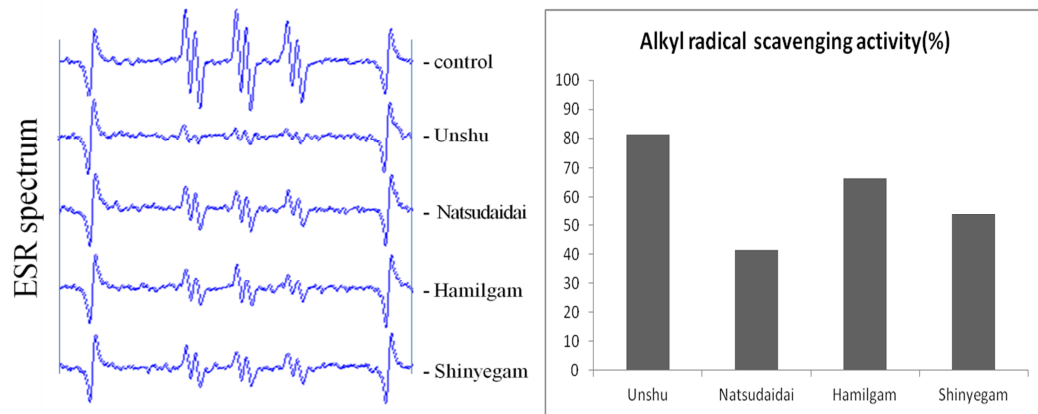


Figure 49. DPPH radical (A), hydroxyl radical (B) and alkyl radical (C) scavenging activities of citrus essential oil by ESR.

3) 온주, 하귤, 하밀감 및 신예감 정유 성분의 항균 활성

여드름의 발생은 일반적으로 피지 생산 증가, *P. acnes*의 모낭 증식, 호르몬 분비 등의 여러 인자가 복합적으로 작용하며, 여드름 발생에 관여하는 미생물도 *P. acnes* 뿐만 아니라 *S. aureus*, *S. epidermidis* 등과 같은 피부 상재균들이 알려져 있다. 품종 별 감귤 과피 정유의 항균 활성 측정은 paper disc 확산 법으로 확인하였다. 항균 활성 실험에는 여드름을 유발하는 *P. acnes*를 사용하였고, 항생제내성균주은행에서 분양 받아 사용하였다. 현재 여드름 치료에는 triclosan, azelic acid, tetracyclin 등의 항생제가 사용되고 있으나, 피부 건조증이나 과민증 유발, 특히 항생제에 대한 내성 발생 등의 부작용이 알려져 지속적인 사용이 어려운 실정이다. 따라서 많은 연구에서 항균 효과가 있으면서 부작용이 없고, 내성이 생기지 않는 천연물 유래 여드름 치료제를 개발하려고 노력 중이다. 천연물 유래 에센셜 오일의 경우 팔마로사와 제라늄의 주요 성분인 geranol 등이 우수한 항균력을 보인다고 보고되어 있다.⁶²

품종별 감귤 정유의 항균 활성 결과는 다음과 같이 *P. acnes* 4종에 대해 생육 억제환을 생성하였다(Table 16, Figure 50).

항균 활성이 우수한 것으로 알려진 limonene에 의해 대체적으로 감귤 정유에는 항균 활성이 있을 것이라 판단되며 품종별 정유의 항균 활성은 정유에 포함되어있는 monoterpene hydrocarbon류와 monoterpene alcohol류 함량 차이에 따라 활성의 차이가 있는 것으로 사료된다.⁶³

Table 16. Antimicrobial activities of ‘Unshu’, ‘Natsudaidai’, ‘Hamilgam’, and ‘Shinyegam’ essential oils on *P. acnes*

* Unit: mm, disc size: 8 mm

	<i>P. acnes</i> CCARM 0081	<i>P. acnes</i> CCARM 9009	<i>P. acnes</i> CCARM 9010	<i>P. acnes</i> CCARM 9089
Unshu	10	9	10	N.D.
Natsudaidai	11	10	11	9
Hamilgam	11	10	11	9
Shinyegam	11	9.5	10	8.5

* N. D. : Not Detected

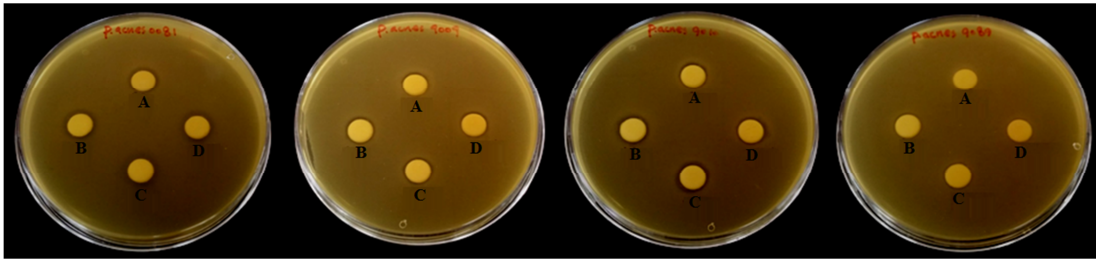


Figure 50. Antimicrobial activities of ‘Unshu’ (A), ‘Natsudaidai’ (B), ‘Hamilgam’ (C), and ‘Shinyegam’ (D) essential oils on *P. acnes*.

IV. 종합 결론 및 고찰

감귤에는 플라보노이드, 카로티노이드, 리모노이드 등 다양한 기능성 성분을 함유하는 것으로 알려져 있으며, 이 중 플라보노이드는 60여 종이 존재하는 것으로 보고되고 있다.⁶⁴ 감귤에 존재하는 플라보노이드류는 flavanones, flavones과 polymethoxyflavone (PMF)으로 구분할 수 있고, 이들 대부분은 과피에 집중적으로 존재한다.⁶⁵

국내산 감귤의 플라보노이드 함량에 대한 연구로는 제주 재래귤,⁶⁶ 만감류,⁶⁷ 온주밀감,⁶⁸ 감귤 착즙박,⁶⁹ 감귤 유래 생약⁷⁰ 등이 보고되어 있으며, 기능성에 대한 연구로는 혈압강하효과,⁷¹ 항산화 활성,⁶⁶ 췌장암 억제효과,^{72,73} 비만억제⁷³ 등 다양하게 이루어지고 있다.

제주의 감귤 산업은 조수입 9천억 원으로 농업 조수입의 60%를 차지하는 제주 농업의 핵심산업이지만(제주특별자치도, 2014) 재배되고 있는 품종은 10여 가지로 국한되어 있어 감귤산업 발전을 위해서는 제주지역에 알맞은 품종을 도입 선발 또는 신품종 개발이 요구되고 있다. 또한 최근 기능성에 대한 선호도가 높아지는 추세이기 때문에 도입선발 또는 육종도 기능성 성분을 많이 함유하는 방향으로 목표를 설정하고 있다. 따라서 기능성 물질을 많이 함유하는 품종 육종을 위해서는 감귤 유전자원에 대한 기능성 성분 분석이 우선시 되어야 한다.⁷⁴

감귤의 기능성 성분은 플라보노이드 뿐만 아니라 과피의 유포(油胞)층에 함유되어 있는 정유(精油)에 관한 연구도 주목 받고 있는데 식물의 정유 성분은 방향효과¹¹, 항염¹², 항균¹³ 및 방부효과¹⁴에 대한 연구가 주로 이루어져 있다. 감귤의 정유는 동일 종에서도 기후, 풍토, 과실의 온숙 및 저장의 시간적 변화 등에 의해서 성분의 변화가 있으며 세정제, 식품향료 의약품 등에 첨가제로 널리 이용되고 있다. 주성분인 limonene은 인체 및 환경에 유해한 영향을 주지 않는 물질로 세정제³로 사용되고 있다. 감귤 정유와 관련하여 진행된 연구들은 온주밀감 완숙과 유래 감귤 정유에만 국한되어 진행되어 오다가 최근 부지화¹⁷ 및 감귤류 미숙과¹⁶에 관한 연구가 진행되고 있다.

감귤의 기능성 물질은 완숙과 보다 미숙과에 다량 함유 되어 있다고 알려져 있는데, 연구 결과에 따르면 과실이 성숙할수록 당도는 높아지고 플라보노이드 함량 및 조성은 감소하며,^{66,75} 수확시기가 늦어질수록 대부분 감소하는

경향⁶⁶을 보인다고 보고되어 있다. 이는 과실이 성숙할수록 함유하고 있는 성분은 비당체(aglycone)에서 배당체(glycone) 형태로 전환되고, 배당체보다 비당체가 좀 더 효과적으로 우리 몸에 흡수되기 때문에, rutinoid 형태의 물질이 가수분해 과정을 거쳐 비당체의 형태로 전환되면 흡수가 촉진되어 혈장, 담즙, 소변 등에 더 높은 농도로 존재하여 대식세포에서의 염증억제와 암세포에서 항암효과⁶를 나타낸다고 보고되어 있다.

따라서 완숙과보다 미숙과에서 다양한 생리 활성이 있는 유효 성분을 탐색하는 연구가 필요하다고 사료되며 본 연구에서는 제주 재래귤, 부지화 미숙과 및 감귤 정유 성분의 분석 및 생리 활성 평가를 통하여 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성을 검토하였다.

제주 재래귤 10종의 플라보노이드 분포를 확인해 본 결과 당유자, 편귤 및 지각 품종에서는 naringin 및 neohesperidin이 주성분으로 확인되었으며, 감자, 유자 및 사두감 품종은 narirutin 및 hesperidin으로 구성되어 있었다. 또한 홍귤, 병귤, 진귤 및 빈귤 품종은 hesperidin 및 rutin과 더불어 PMF로 분류되는 nobiletin 및 tangeretin이 다량 함유 되어 있었다.

감귤속(*Citrus*)의 대다수 종 또는 품종들은 다배성 등의 요인에 의해 복잡하게 분화되어 있어 학자들 간에 서로 다른 분류와 명명으로 많은 논란이 되었다. 전통적인 분류법으로 Tanaka (1977)와 Swingle (1946)의 분류가 가장 광범위하게 이용되고 있고 DNA를 및 품종간 분류 연구 또한 이루어져 왔다.² 하지만 최근 품종별 기능성 물질에 대한 연구가 다수 보고되어 있고 감귤속 종들의 명확한 분류와 명명을 위해 형태학적 형질과 함께 생화학적인 요인을 유연관계 해석에 적용할 수 있는 연구가 필요하다고 사료된다.

품종별 플라보노이드 정성·정량 분석 결과에 따라 본 연구에 사용된 재래귤 10종은 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)를 이용한 품종간 유연관계 분석 결과²와 일부 유사한 결과를 보였다. 분석된 품종 중 홍귤, 진귤 및 빈귤은 PMF가 다량 함유 되어 있는 특징이 있었는데 최근 연구결과에 따르면 PMF는 상호간 상관관계가 높고, sinensetin, tangeretin 및 nobiletin은 정의 상관관계가 나타난다고 보고되었다.⁷⁴ 또한 외부형태적인 형질의 다변량 해석에 의한 재래감귤간의 유연관계 분석⁷⁶에서 홍귤, 진귤 및 빈귤은 하나의 군으로 나타났으며, 동위효소분석⁷⁷에서 이들은 동일 품종의 후손일 가능성이 높다고 추정된 바 있다. 본 연구의 플라보노이드 조성 등

생화학적 분석 결과를 적용함으로써 보다 명확하게 재래감귤을 분류할 수 있는 유용한 지표가 될 것으로 사료된다.

부지화 미숙과에서 MPLC를 이용하여 분리된 4가지 화합물 중 PMF로 분류되는 6,7,8,3',4'-pentamethoxyflavone 및 tetramethyl-*O*-scutellarin에 대한 활성 실험을 진행한 결과 DPPH 및 ABTS radical에 대한 소거 활성을 보였다. 또한 tetramethyl-*O*-scutellarin은 nitric oxide 및 염증 관련 cytokine의 생성을 효과적으로 억제하였으며, 멜라닌 생성 억제 활성도 확인하였다. 6,7,8,3',4'-pentamethoxyflavone은 melanoma cell에서 멜라닌 생성을 증가시키는 결과를 얻었고, 이는 추가적인 기전연구를 통하여 흰머리 방지 소재로서의 활용 가능성이 기대된다.

온주, 하귤, 하밀감 및 신예감 과피 정유의 분석 결과 limonene이 85% 이상 차지하고 있었고, γ -terpene, β -myrcene, linalool, octanal (1.88%) 등이 함유되어 있었다. 네 가지 품종의 정유를 ESR을 이용하여 radical 소거능을 측정한 결과 DPPH, hydroxyl, alkyl radical을 효과적으로 억제하였으며, 특히 네 품종 모두 alkyl radical에 대한 소거능이 뛰어난 것을 확인할 수 있었다. 이러한 정유는 피부상재균(*P. acnes*, *S. aureus*)에 대한 항균 활성을 보였으며 특히 하귤 및 하밀감 정유에서 좋은 활성을 보였다.

본 연구 결과에 따라 제주산 감귤류의 미숙과 및 정유 성분은 대부분의 품종에서 좋은 항산화 및 항염증 효과를 보였다. 이러한 감귤 유래 추출물 및 분리된 화합물에 대해 현재 *in vitro* 상에서 검증된 효능이 추후 *in vivo* 상에서 추가 검증이 필요하다고 사료되며, 적과 작업을 통해 한 해 수만 톤씩 발생되어 감귤 폐자원은 다양한 기능성 소재로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

V. 참고문헌

1. 오윤옥. 제주도 감귤재배의 기원과 분포에 관한 연구, *고려대학교 교육대학원* 1994, 석사학위논문.
2. 김광식; 윤수현; 박재호; Deng, L.; Hong, Q.; Jang, D. 감귤 및 감귤근연속의 탐색, 수집, 보존 및 이용연구, *농촌진흥청* 2006.
3. (주)인포베이스. 감귤류 특허기술 동향조사 보고서, (재)제주하이테크산업진흥원 제주전략산업기획단 2005.
4. Kang, S. I.; Shin, H. S.; Kim, H. M.; Hong, Y. S.; Yoon, S. A.; Kang, S. W.; Kim, J. H.; Kim, M. H.; Ko, H. C.; Kim, S. J. Immature Citrus sunki peel extract exhibits antiobesity effects by β -oxidation and lipolysis in high-fat diet-induced obese mice, *BiolPharmBull* 2012, 35, 223-230.
5. Ejaz, S.; Ejaz, A.; Matsuda, K.; Lim, C. W. Limonoids as cancer chemopreventive agents, *J Sci Food Agric* 2006, 86, 339-345.
6. Tripoli, E.; Guardia, M. L.; Giammanco, S.; Majo, D. D.; Giammanco, M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review, *Food Chem Toxicol* 2007, 104, 466-479.
7. Tsai, S. H.; Lin-Shiau, S. Y.; Lin, J. K. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol, *Br J Pharmacol* 1999, 126, 673-680.
8. Hertog, M. G.; Feskens, E. J.; Hollman, P. C.; Katan, M. B.; Kromhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study, *Lancet* 1993, 342, 1007-1011.

9. Peterson, J.; Dwyer, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity, *Nutr Res* **1998**, *18*, 1995-2018.
10. Kim, Y. D.; Ko, W. J.; Koh, K. S.; Jeon, Y. J.; Kim, S. H. Composition of Flavonoids and Antioxidative Activity from Juice of Jeju Native Citrus Fruits during Maturation, *Korean J Nutr* **2009**, *42*.
11. Iwasa, M.; Nakaya, S.; Maki, Y.; Marumoto, S.; Usami, A.; Miyazawa, M. Identification of Aroma-active Compounds in Essential Oil from *Uncaria Hook* by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Gas Chromatography-Olfactometry, *J Oleo Sci* **2015**, *64*, 825-833.
12. Kim, S. S.; Kim, J. E.; Hyun, C. G.; Lee, N. H. *Neolitsea aciculata* Essential Oil Inhibits Drug-Resistant Skin Pathogen Growth and *Propionibacterium ances*-Induced Inflammatory Effects of Human Monocyte Leukemia, *Natural Product Communications* **2011**, *6*.
13. El-Soud, N. H.; Deabes, M.; El-Kassem, L. A.; Khalil, M. Chemical Composition and Antifungal Activity of *Ocimum basilicum* L. Essential Oil, *Open Access Maced J Med Sci* **2015**, *3*, 374-379.
14. Kahraman, T.; Issa, G.; Bingol, E. B.; Kahraman, B. B.; Dumen, E. Effect of rosemary essential oil and modified-atmosphere packaging (MAP) on meat quality and survival of pathogens in poultry fillets, *Braz J Microbiol* **2015**, *46*, 591-599.
15. 한국아로마테라피협회. 제주산 식물자원 essential oil 의 산업화 가능성 평가 연구, (재)제주하이테크산업진흥원 제주전략산업기획단 **2005**.
16. 오태현. 우묵사스레피 및 감귤류 미숙과를 이용한 향장품 소재 연구, 제주대학교 **2011**, 박사학위논문.

17. Kim, S. S.; Hyun, J. M.; Kim, K. S.; Park, K. J.; Park, S. M.; Choi, Y. H. Influence of Essential Oil in 'Shiranuhi' Immature Fruit on Antioxidant and Antimicrobial Activities, *J Korea J Medicinal Crop Sci* **2013**, *261*, 493-497.
18. Jung, S. K.; Lee, K. W. Industrial Status of Oriental Medicine Cosmetics, *Food Science and Industry* **2012**, *45*.
19. Kim, K. D.; Kim, S. J. Studies on the antimicrobial effects of herbal extracts and it's cosmetic application, *J Kor Soc Cosmet* **2007**, *13*, 221-227.
20. Lee, S. Y.; Seo, H. S. The Effects of Sulfur extract on Anti-inflammation and Anti-propionibacterium acnes, *J Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology* **2007**, *20*, 68-76.
21. 하병조. 기능성화장품, *신광출판사* **2001**.
22. Tizard, I. R.; Schubot, R. M. Veterinary Immunology: An Introduction, *W. B Saunders Company* **2004**.
23. Tizard, I. R. Immunology, An introduction inflammation, *Saunders Collage Publishing* **1986**, *2*, 423-441.
24. Lee, E. S.; Ju, H. K.; Moon, T. C.; Lee, E.; Jahng, Y.; Lee, S. H.; Son, J. K.; Baek, S. H.; Chang, H. W. Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production by propenone compound through blockade of nuclear factor (NF)-kappa B activation in cultured murine macrophages, *Biol Pharm Bull* **2004**, *27*, 617-620.
25. Higuchi, M.; Higashi, N.; Taki, H.; Osawa, T. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages, *J Immunol* **1990**, *144*, 1425-1431.

26. Hippeli, S.; Elstner, E. F. Inhibition of biochemical model reactions for inflammatory processes by plant extracts: a review on recent developments, *Free Radic Res* **1999**, *31*, S81-87.
27. McCartney-Francis, N.; Allen, J. B.; Mizel, D. E.; Albina, J. E.; Xie, Q. W.; Nathan, C. F.; Wahl, S. M. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase, *J Exp Med* **1993**, *178*, 749-754.
28. Otto, J. C.; Smith, W. L. The orientation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 in the endoplasmic reticulum, *J Biol Chem* **1994**, *269*, 19868-19875.
29. DeWitt, D. L.; Smith, W. L. Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence, *Proc Natl Acad Sci* **1988**, *85*, 1412-1416.
30. Merlie, J. P.; Fagan, D.; Mudd, J.; Neeleman, P. Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *J Biol Chem* **1988**, *263*, 3550-3553.
31. Morita, M.; Schindler, M.; Regier, M. K.; Otto, J. C. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2, *J Biol Chem* **1995**, *270*, 10902-10908.
32. Herschman, H. R. Prostaglandin synthase 2, *Biochim Biophys Acta* **1996**, *1299*, 125-140.
33. Reddy, S. T.; Herschman, H. R. Ligand-induced prostaglandin synthesis requires expression of the TIS10/PGS-2 prostaglandin synthase gene in murine fibroblasts and macrophages, *J Biol Chem* **1994**, *269*, 15473-15480.

34. Masferrer, J. L.; Jweifel, B. S.; Manning, P. T.; Hauser, S. D.; Leahy, K. M.; Smith, W. G.; Isakson, P. C.; Seibert, K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic, *Proc Natl Acad Sci* **1994**, *91*, 3288–3232.
35. 현동희; 현광철; 양원석; 오승진. 세토카(천혜향) 재배기술, *제주특별자치도농업기술원 서귀포농업기술센터* **2012**.
36. 제주농협지역본부. 2012 년 감귤 유통처리 실태분석, *제주농협지역본부* **2013**.
37. Gutfinger, T. Polyphenols in olive oils, *J Am Oil Chem Soc* **1981**, *58*, 966–968.
38. Moreno, M. N.; Isla, M. I.; Sampietro, A. R.; Vattuone, M. A. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina, *J Ethnopharmacology* **2000**, *71*, 109–114.
39. Blois, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature* **1958**, *181*, 1199–1200.
40. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic Biol Med* **1999**, *26*, 1231–1237.
41. Guo, Q.; Corbett, J. T.; Yue, G.; Fann, Y. C.; Qian, S. Y.; Tomer, K. B.; Mason, R. P. Electron spin resonance investigation of semiquinone radicals formed from the reaction of ubiquinone 0 with human oxyhemoglobin, *J Biol Chem* **2002**, *277*, 6104–6110.
42. Ashton, T.; Young, I. S.; Peters, J. R.; Jones, E.; Jackson, S. K.; Davies, B.; Rowlands, C. C. Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study, *J Appl Physiol* **1999**, *87*, 2032–2036.

43. Davies, M. J.; Slater, T. F. The use of electron-spin-resonance techniques to detect free-radical formation and tissue damage, *Proc Nutr Soc* **1988**, *47*, 397-405.
44. Nanjo, F.; Goto, K.; Seto, R.; Suzuki, M.; Sakai, M.; Hara, Y. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, *Free Radic Biol Med* **1996**, *21*, 895-902.
45. Katsube, T.; Tabata, H.; Ohta, Y.; Yamasaki, Y.; Anuurad, E.; Shiwaku, K.; Yamane, Y. Screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin-Ciocalteu assay, *Journal of agricultural and food chemistry* **2004**, *52*, 2391-2396.
46. Kawaguchi, K.; Mizuno, T.; Aida, K.; Uchino, K. Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and *Pseudomonas*, *Biosci Biotechnol Biochem* **1997**, *61*, 102-104.
47. 이남호. 천연물화학, *신일서적(주)* **2014**.
48. Kim, H. H.; Park, G. H.; Park, K. S.; Lee, J. Y.; An, B. J. Anti-oxidant and anti-inflammatory activity of fractions from *Aster glehni* Fr. Schm, *Kor J Microbiol Biotechnol* **2010**, *38*, 434-441.
49. Li, S.; Lo, C. Y.; Ho, C. T. Hydroxylated polymethoxyflavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) peel, *Journal of agricultural and food chemistry* **2006**, *54*, 4176-4185.
50. Baik, S. O.; Bock, J. Y.; Chun, H. J.; Jeong, S. I.; Baek, S. H.; Oh, H. B.; Kim, I. K. Analysis and Quantitative Distribution of Glycosided Flavonoids in Citruses and Korean Chung-pi, *Analytical Science & Technology* **2001**, *14*.

51. Kim, Y. J.; Son, D. Y. Inflammatory mediator regulation of the *Zizyphus jujube* leaf fractions in the LPS-stimulated Raw264.7 mouse macrophage, *Korean J Food Preserv* **2014**, *21*, 114-210.
52. 송희경. 당유자 미숙과 추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향, *건국대학교 2014, 석사학위논문*.
53. Lee, H. J.; Kang, G. J.; Yoon, W. J.; Kang, H. K.; Kim, Y. S.; Kim, S. M.; Yoo, E. S. Anti-inflammatory Effect of Unripe Fruit of *Citrus grandis* Osbeck in RAW264.7 and HaCaT Cells, *Kor J Phamacogn* **2006**.
54. Choi, B. K.; Kim, T. W.; Lee, D. R.; Jung, W. H.; Lim, J. H.; Jung, J. Y.; Yang, S. H.; Suh, J. W. A polymethoxy flavonoids-rich *Citrus aurantium* extract ameliorates ethanol-induced liver injury through modulation of AMPK and Nrf2-related signals in a binge drinking mouse model, *Phytother Res* **2015**, *29*, 1577-1584.
55. Sato, T.; Takahashi, A.; Kojima, M.; Akimoto, N.; Yano, M.; Ito, A. A citrus polymethoxy flavonoid, nobiletin inhibits sebum production and sebocyte proliferation, and augments sebum excretion in hamsters, *J Invest Dermatol* **2007**, *127*, 2740-2748.
56. Dong, H.; Chen, H. D.; Zhao, Y. J.; Li, H. M. Polymethoxy flavones do not exert an inducing effect on the biosynthesis and secretion of insulin by pancreatic beta-cells, *Bio med Rep* **2014**, *2*, 287-291.
57. Kim, Y. D.; Mahinda, S.; Koh, K. S.; Jeon, Y. J.; Kim, S. H. Reactive Oxygen Species Scavenging Activity of Jeju Native Citrus Peel during Maturation, *J Korean Soc Food Sci Nutr* **2009**, *38*, 462-469.
58. Kim, J. H.; Kwon, S. H.; Kim, J. K.; Kim, M. K. Effect of different mandarin formulation on antioxidative capacity and oxidative DNA damage in fifteen-month aged rats, *Korean J Nutr* **2006**, *39*, 610-616.

59. Kim, W. B.; Park, S. H.; Hwang, H. S.; Woo, J. Y.; Lee, H. R.; Hwang, D. Y.; Choi, J. H.; Lee, H. Antioxidative activities and whitening effects of solvent fraction from *Prunus davidiana* (Carriere) Franch. Fruit, *J Korean Soc Food Sci Nutr* **2012**, *41*, 1363–1370.
60. Yoshigai, E.; Machida, T.; Okuyama, T.; Mori, M.; Murase, H.; Yamanishi, R.; Okumura, T.; Ikeya, Y.; Nishino, H.; Nishizawa, M. Citrus nobiletin suppresses inducible nitric oxide synthase gene expression in interleukin-1 β -treated hepatocytes, *Biochem Biophys Res Commun* **2013**, *439*.
61. Roberto, D.; Micucci, P.; Sebastian, T.; Graciela, F.; Anesini, C. Antioxidant activity of limonene on normal murine lymphocytes: relation to H₂O₂ modulation and cell proliferation, *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **2010**, *106*, 38–44.
62. Kim, H. S.; Lee, H. Y.; Lee, J. N.; Joo, C. G.; Choe, T. B. The effect of antimicrobial properties of Manuka oil and Improvement of acne, *J of the Korean Society of Cosmetology* **2011**, *17*, 245–256.
63. Bevilacqua, A.; Corbo, M. R.; Sinigaglia, M. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of eugenol, limonene, and citrus extract against bacteria and yeasts, representative of the spoiling microflora of fruit juices, *J Food Prot* **2010**, *73*, 888–894.
64. Horowitz, R. M.; Gentili, B. Flavonoid constituents of citrus, *Citrus Science and Technology*, **1977**.
65. Nogata, Y.; Sakamoto, K.; Shiratsuchi, H.; Ishil, T.; Yano, M.; Ohta, H. Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **2006**, *70*, 178–192.

66. Kim, Y. D.; Ko, W. J.; Koh, K. S.; Jeon, Y. J.; Kim, S. H. Composition of flavonoids and antioxidative activity from juice of Jeju native citrus fruits during maturation, *Korean J Nutr* **2009**, *42*, 278-290.
67. Lee, C. H.; Kang, Y. J. HPLC analysis of some flavonoids in citrus fruits, *Korean J Post-harvest Sci Technol Agri Products* **1997**, *4*, 181-187.
68. Kim, Y. C.; Koh, K. S.; Koh, J. S. Changes of some flavonoids in the peel of satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) harvested during maturation, *Agric Chem Biotechnol* **2001**, *44*, 143-146.
69. Yang, Y. T.; Kim, M. S.; Hyun, K. H.; Kim, Y. C.; Koh, J. S. Chemical constituents and flavonoids in citrus pressed cake, *Korean J Food Preserv* **2008**, *15*, 94-98.
70. Hyon, J. S.; Kang, S. M.; Senevirathne, M.; Koh, W. J.; Yang, T. S.; Oh, M. C.; Oh, C. K.; Jeon, Y. J.; Kim, S. H. Antioxidative activities of extracts from dried *Citrus sunki* and *C.unshiu* peels, *J Korean Soc Food Sci Nutr* **2010**, *39*, 1-7.
71. Son, H. S.; Kim, H. S.; Kwon, T. B.; Ju, J. S. Isolation, purification and hypotensive effect of bioflavonoids in *Citrus sinensis*, *J Korean Soc Food Sci Nutr* **1992**, *21*, 136-142.
72. Zhang, Y.; Dou, H.; Li, H. M.; He, Z.; Wu, H. The citrus flavonoid nobiletin inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells *invitro*, *J Korean Soc Food Sci Nutr* **2014**, *23*, 225-229.
73. Choi, Y. H.; Lee, Y. J.; Lee, S. Y.; Chae, C. W.; Park, S. M.; Kim, S. S.; An, H. J.; Han, C. H.; Hong, H. J. Effect of concentrated Dangyooja-derived flavonoids extract added to citrus beverage on obesity and blood lipids in rats, *Kor J Hort Sci Technol* **2012**, *30*, 214-219.

74. Park, Y. C.; Yang, Y. T.; Kim, J. Y.; Lee, C. H.; Kang, S. H.; Kang, J. H. Characteristics of Flavonoids in Juice and Cluster Analysis of Satsuma Mandarin Germplasms, *Korean J Plant Res* **2015**, *28*, 16-25.
75. Kim, Y. C.; Koh, K. S.; Koh, J. S. Changes of flavonoids in the peel of Jeju native citrus fruits during maturation, *Korean J Nutr* **2001**, *42*, 278-290.
76. 김한용. Distribution, taxonomy, horticultural characters of the local Citrus spp. in Cheju, and the genetic markers among them, *전남대학교* **1988**, 박사학위논문.
77. 문두길. 제주 재래 감귤의 동위효소 분석과 교잡실생의 조기식별 방법에 관한 연구 **1986**.

감사의 글

마냥 후련할 줄 알았던 마지막 페이지...

설렘과 기대, 걱정과 두려움. 여러 감정들이 지금 제 심장을 뛰게 합니다.

아직도 많이 부족한 저를 그 동안 지도해 주시고, 박사과정 생활을 잘 마무리 할 수 있게 도와주신 이남호 교수님께 깊은 감사의 말씀을 드립니다.

논문 심사에 아낌없는 조언을 해 주셨던 김덕수 교수님, 김원형 교수님, 이선주 교수님, 복도에서 뵈 때마다 미소로 맞아주시며 항상 걱정해주신 강창희 교수님을 비롯하여 늘 열정 가득하신 제주대학교 화학·코스메틱스학과 교수님들께 감사의 말씀 전합니다. 그리고 바쁘신 가운데 귀한 시간 내주셔서 논문 심사 해 주신 국립낙동강생물자원관 이욱재 본부장님께도 감사 드립니다.

아무 것도 몰랐던 학부시절부터 이렇게 박사과정까지 마무리하는 10년 가까운 시간 동안 흔들릴 때는 바로 잡아주시고, 좋은 일에는 더없이 기뻐해주시며 항상 아낌없이 응원해주신 농촌진흥청 국립원예특작과학원 감귤연구소 최영훈 소장님께 특별히 감사의 말씀을 전합니다.

석사학위에 이어 박사학위도 감귤에 대한 연구를 계속 할 수 있게 도와주신 감귤연구소 많은 연구관님과 연구사님들께 감사 드립니다. 특히 제 고향과도 같은 이용소재연구실에서 언제나 반갑게 맞아주시는 안현주 연구관님, 박경진 연구사님과 더불어 이용소재연구실 연구원 분들께도 감사 드립니다.

박사과정 진학에 고민했을 때부터 이렇게 무사히 마무리 하기까지 늘 진심 어린 조언을 아끼지 않으시고 물심양면으로 도와주신 현창구 교수님과 김상숙 박사님께도 깊이 감사 드립니다.

졸업이라는 같은 목적지를 향해 밤낮없이 함께 지냈던 시간들 가운데 힘들 때도 있었지만 서로 많이 의지했고, 옆에서 힘이 되어준 정은이. 함께 동고동락하며 굶은 일 마다하지 않고 항상 즐거운 마음으로 함께 해 주는 연정이, 희수, 종택이, 현숙이, 형석이, 민영이. 그리고 늘 진심으로 응원해주는 용범이, 형민이, 승리를 비롯한 유기화학실험실 선후배님들 모두 고맙습니다.

학교생활에 적응하는데 많은 도움을 주었던 종석이. 매사에 열심히 생활하며 늘 밝고 명랑한 지선이, 매일같이 찾아가도 반겨주는 화장품화학실험실 대학원생들과 연구원 분들께도 감사 드립니다.

박사학위 논문심사부터 논문 마무리 하는 마지막까지 하나하나 신경 써주시고, 연구에 대한 조언도 아끼지 않으셨던 분석화학실험실 송정민 박사님께도 감사의 말씀 드립니다.

학위 받는다고 가장 기뻐하셨던 우리 할머니.

제 선택에 힘을 실어 주시고 언제나 든든한 버팀목이 되어주시는 엄마, 아빠. 이젠 동생보다 친구 같은 세상에 둘도 없는 단짝, 내 소울메이트 우정, 동관. 언제나 한결같이 갖은 투정 다 받아주고 항상 웃음만 주는 내 친구들.

감사의 글을 쓰면서 세상은 절대로 혼자 살아갈 수 없다는 것을 다시 한번 느낍니다. 일일이 나열할 수 없이 이보다 많은 분들께서 제 곁에서 힘을 주셨고, 앞으로도 이분들께 절대로 누가 되지 않는 사람이 되겠습니다. 지금 이 마음 늘 잊지 않고 감사하며 살겠습니다.

2016. 06.

현 주 미